

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**Búsqueda de genes implicados simultáneamente en
la resistencia a los antibióticos y la virulencia de
*Pseudomonas aeruginosa***

Tesis Doctoral

Alicia Fajardo Lubián

Centro Nacional de Biotecnología

Madrid, 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**Búsqueda de genes implicados simultáneamente en
la resistencia a los antibióticos y la virulencia de
*Pseudomonas aeruginosa***

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por:

Alicia Fajardo Lubián

Director: Dr. José Luis Martínez Menéndez

Tutor: Dr. Fernando Rojo de Castro

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	7
1.1 Resistencia a los antibióticos	7
1.1.1 <i>Mecanismos de resistencia a los antibióticos</i>	7
1.2 Efectos de la resistencia en la fisiología bacteriana	8
1.3 Relación entre la resistencia a los antibióticos y la virulencia bacteriana	9
1.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.4.1 <i>Factores de virulencia adheridos a la superficie celular bacteriana</i>	12
1.4.2 <i>Factores de virulencia secretados</i>	13
1.4.3 <i>Sistema de Secreción Tipo III (T3SS)</i>	15
1.4.4 <i>Quórum-sensing (QS)</i>	19
1.4.5 <i>Formación de biofilms y motilidad en P. aeruginosa</i>	22
1.4.6 <i>Patogénesis de P. aeruginosa en las infecciones respiratorias</i>	24
2 OBJETIVOS	27
3 MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1 Material biológico, plásmidos y oligonucleótidos	29
3.2 Medios, soluciones y condiciones de cultivo	34
3.2.1 <i>Condiciones de crecimiento para la bacteria</i>	34
3.2.2 <i>Condiciones de crecimiento para células eucariotas</i>	34
3.3 Técnicas de DNA	34
3.3.1 <i>Técnicas generales</i>	34
3.3.2 <i>Amplificación de DNA</i>	35
3.4 Manipulaciones genéticas	35
3.4.1 <i>Técnicas generales</i>	35
3.4.2 <i>Construcción de estirpes mutantes de delección</i>	35
3.4.3 <i>Construcción de cepas para ensayos de complementación</i>	36
3.5 Técnicas de proteínas	36
3.5.1 <i>Técnicas generales</i>	36
3.5.2 <i>Análisis de las proteínas del Sistema de Secreción Tipo III</i>	37
3.6 Técnicas para determinar el fenotipo de los mutantes	37
3.6.1 <i>Determinación de la sensibilidad a los antibióticos de los mutantes</i>	37
3.6.2 <i>Ensayos de identificación de actividad β-lactamasa</i>	37
3.6.3 <i>Ensayo de infección en células eucariotas</i>	38
3.6.4 <i>Análisis de piocianina</i>	38
3.6.5 <i>Análisis de pioverdina</i>	38
3.6.6 <i>Formación de biofilms</i>	38
3.6.7 <i>Ensayo de proteasas</i>	39
3.6.8 <i>Análisis estadístico de los datos</i>	39
3.6.9 <i>Ensayos de motilidad</i>	39
3.7 Técnicas de infección <i>in vivo</i>	39
3.7.1 <i>Preparación del inóculo para la infección pulmonar en ratón</i>	39
3.7.2 <i>Protocolo de infección pulmonar con P. aeruginosa en el modelo ratón</i>	40
3.7.3 <i>Análisis de los parámetros derivados de la infección pulmonar</i>	40
4 RESULTADOS	43
4.1 Selección de mutantes con cambios en la sensibilidad a los antibióticos	43
4.2 Análisis de la citotoxicidad de los mutantes con sensibilidad a los antibióticos alterada	45
4.3 Determinación del lugar de inserción del transposón	46
4.4 Expresión del Sistema de Secreción Tipo III en los mutantes con cambios en sensibilidad a los antibióticos y citotoxicidad	53

4.5	Análisis de factores de virulencia regulados por el Sistema de Quórum-Sensing en mutantes con cambios simultáneos en sensibilidad a los antibióticos y virulencia.....	58
4.6	Efecto de la inserción del transposón sobre la motilidad de <i>P. aeruginosa</i>	61
4.7	Análisis de un posible sistema regulador de dos componentes implicado simultáneamente en resistencia y virulencia en <i>P. aeruginosa</i>	70
4.8	Análisis de una nueva betalactamasa de <i>P. aeruginosa</i> implicada en la virulencia de esta bacteria.....	75
4.8.1	Medida de actividad β -lactamasa	77
4.8.2	Análisis de la virulencia del mutante de delección en el gen PA5542 en la cepa PA14 y del mutante complementado.....	79
4.9	Análisis de una proteína perteneciente a un sistema implicado en la modulación intracelular de los niveles de di-GMPc.....	82
4.10	Análisis de un posible transportador tipo RND implicado en la resistencia y la virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	86
4.11	Modelos <i>in vivo</i> de infección pulmonar aguda y crónica con <i>P. aeruginosa</i>	89
4.11.1	Infección aguda.....	89
4.11.2	Infección crónica.....	90
5	DISCUSIÓN.....	95
5.1	Mutantes de <i>P. aeruginosa</i> con cambios en la sensibilidad a los antibióticos.....	95
5.2	Análisis de la citotoxicidad de mutantes de <i>P. aeruginosa</i> con sensibilidad a los antibióticos alterada.....	98
5.3	Análisis de factores de virulencia regulados por el Sistema de Quórum-Sensing en mutantes con cambios simultáneos en sensibilidad a los antibióticos y virulencia.....	101
5.4	Análisis de un posible sistema regulador de dos componentes implicado simultáneamente en resistencia a los antibióticos y virulencia en <i>P. aeruginosa</i>	105
5.5	Análisis de una nueva betalactamasa de <i>P. aeruginosa</i> implicada en la virulencia y la resistencia de esta bacteria	106
5.6	Análisis de una proteína de fusión implicada en la modulación intracelular de los niveles de di-GMPc.....	107
5.7	Análisis de un transportador tipo RND implicado en la resistencia y la virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	108
5.8	Modelos de infección crónica en pulmón de ratón con <i>P. aeruginosa</i>	109
6	CONCLUSIONES	111
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
8	ÍNDICE DE TABLAS	141
9	ÍNDICE DE FIGURAS	143
10	ANEXO I: ARTÍCULOS PUBLICADOS	145

SUMMARY

In hospitals, the capability of bacteria to produce infection relies, not just in their virulence, but in their resistance to antibiotics also. The hypothesis of the current work is the existence of networks, which interconnect antibiotic resistance and virulence of bacterial pathogens. To analyze this potential crosstalk, we have searched genes simultaneously involved in both processes using as a model *Pseudomonas aeruginosa*, a relevant intrinsically-resistant opportunistic pathogen. To that goal, we have screened two transposon-tagged libraries obtained in two different *P. aeruginosa* strains: 59.20 and TB, looking for mutants simultaneously affected in virulence and antibiotic susceptibility. Altered susceptibility to one or more antibiotics was observed in 222 of the 5952 tested mutants (3,7%). The position of the transposon was determined by inverse polymerase chain reaction, sequencing of the amplicons, and comparison to the available sequence of *P. aeruginosa*. After filtering insertions in the same gene, we have detected 118 loci in the genome of *P. aeruginosa* that contribute to its characteristic phenotype of antibiotic susceptibility. Since the genome of *P. aeruginosa* contains 5570 genes, our results indicate that at least 1.8% of its genome contributes to its characteristic phenotype of susceptibility to antibiotics. In the present work, we have identified genes which inactivation increases *P. aeruginosa* susceptibility to several antimicrobials. Those genes define novel targets for the development of anti-resistance drugs. Mutations in other genes make *P. aeruginosa* more resistant and therefore define novel mechanisms for mutation-driven acquisition of antibiotic resistance, opening a new research field based in the prediction of resistance before it emerges in clinical environments. Noteworthy, most mutants had altered susceptibility to multiple antibiotics, indicating that the development of resistance is not specific to a given antibiotic. To evaluate the virulence of the selected mutants, we have studied changes in their cytotoxicity against a macrophage cell line. We obtained that 51% of 222 mutants with changes in susceptibility presented altered cytotoxicity too. There was not an inverse correlation between cytotoxicity and antibiotic resistance. These results point out that acquiring resistance is not always associated with a lower virulence (fitness cost), so the effects of resistance are specific and depending on the type of involved mechanism. After filtering insertion occurring in the same gene, we have detected 73 loci in the genome of *P. aeruginosa* that contribute to its virulence and antibiotic susceptibility simultaneously. Among these loci, only few genes have been previously annotated as antibiotic resistance or virulence genes. Although a few others, are predicted to play a role in these processes in *P. aeruginosa*, the large majority of genes emerging from our screen were not previously thought to play any role in the antibiotic susceptibility or cytotoxicity of this bacterial species. Thus, our work supports the idea that in *P. aeruginosa* resistance and virulence are the consequence of a complex network of elements, including non-classical antibiotic resistance and virulence genes.

We present in detail a study of four of these mutants that present the insertion in genes belonging to different functional categories and could be involved in resistance/virulence crosstalk at different levels. On one hand, we selected two mutants with insertion in genes similar to classical antibiotic resistance determinants. One of them is a putative betalactamase that could be probably involved in peptidoglycan synthesis and the other one is a RND efflux transporter that could be related in cell to cell signalling mediated by QS. On the other hand, we analyzed two mutants in probable sensor/response regulators. One gene belongs to a system that controls the intracellular levels of diGMPc, a molecule known to regulate *biofilm* formation and virulence. The last gene encoded a putative hybrid sensor response regulator that could be involved in signalling networks mediated by small RNAs.

The results of our work validate the hypothesis on the existence of a crosstalk between resistance and virulence and present data for beginning to understand such crosstalk.

1 Introducción

1.1 Resistencia a los antibióticos

Durante las últimas décadas el aumento de la esperanza de vida se ha atribuido, entre otros factores, a la efectividad de los antibióticos para curar las enfermedades infecciosas así como a la posibilidad de utilizar estos antimicrobianos durante la aplicación de técnicas médicas y quirúrgicas para prevenir las infecciones asociadas (380). Sin embargo, debido al uso indiscriminado de los antibióticos, los patógenos bacterianos que antes eran sensibles se están convirtiendo en resistentes (74, 254). Actualmente, uno de los grandes problemas a los que se está haciendo frente en los ambientes clínicos son los causados por los patógenos oportunistas que muestran una baja sensibilidad intrínseca a los antibióticos (226, 348). El aumento de la resistencia a los antimicrobianos, tanto en bacterias previamente sensibles, como en bacterias intrínsecamente resistentes, supone un importante riesgo para la salud e incrementa el peligro asociado a las prácticas médicas comunes, que se apoyan en el uso de antibióticos, para resolver las infecciones con las que están comúnmente asociadas (372).

Para comprender y eventualmente predecir la evolución de la resistencia a los antibióticos de los patógenos bacterianos (219), es necesario estudiar dos problemas diferentes. En primer lugar, la adquisición de un fenotipo de resistencia por las bacterias sensibles, como consecuencia de mutaciones, o mediante transferencia horizontal de genes (HGT) de resistencia (76, 218) que provienen esencialmente de bacterias medioambientales (74). De hecho, las bacterias medioambientales poseen un amplio arsenal de genes de resistencia (resistoma) (387) que pueden ser transferidos a los patógenos humanos (64). Las bacterias comensales también pueden ser el origen de algunas resistencias (330), aunque en este caso lo más frecuente son los procesos de recombinación homóloga (60, 398). En segundo lugar, es necesario destacar la existencia de bacterias intrínsecamente resistentes (102, 149). Esta resistencia está presente en todas las cepas de una especie bacteriana independientemente de su previa exposición a los antibióticos y no es debida a los fenómenos de HGT. Este conjunto de genes del cromosoma de una especie bacteriana ha sido definida, en base a los trabajos de esta tesis, como el resistoma intrínseco propio de dicha especie (102, 149).

Hay que destacar que la mayor parte de las bacterias intrínsecamente resistentes son de origen ambiental (no clínico) y colonizan hábitats en los que están mucho menos expuestas que en los ambientes clínicos a una intensa presión selectiva de antibióticos. Esto sugiere que el papel fisiológico primario de los elementos involucrados en estos fenotipos de resistencia en los ambientes naturales no es conferir resistencia a los antibióticos. El resistoma intrínseco es, además, un fenotipo ancestral común a todas las cepas de una especie bacteriana y que no ha sido adquirido como resultado de la reciente utilización de los antibióticos en clínica (8).

1.1.1 Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Como se muestra en la Figura 1, para poder desarrollar su acción, un antibiótico, tiene que atravesar distintas envueltas celulares (I), bien de modo inespecífico, bien por transportadores específicos. Una vez en el interior, el antibiótico actúa sobre su blanco (II). En algunas ocasiones puede que necesite de enzimas intracelulares para poder activarse (III). (20)

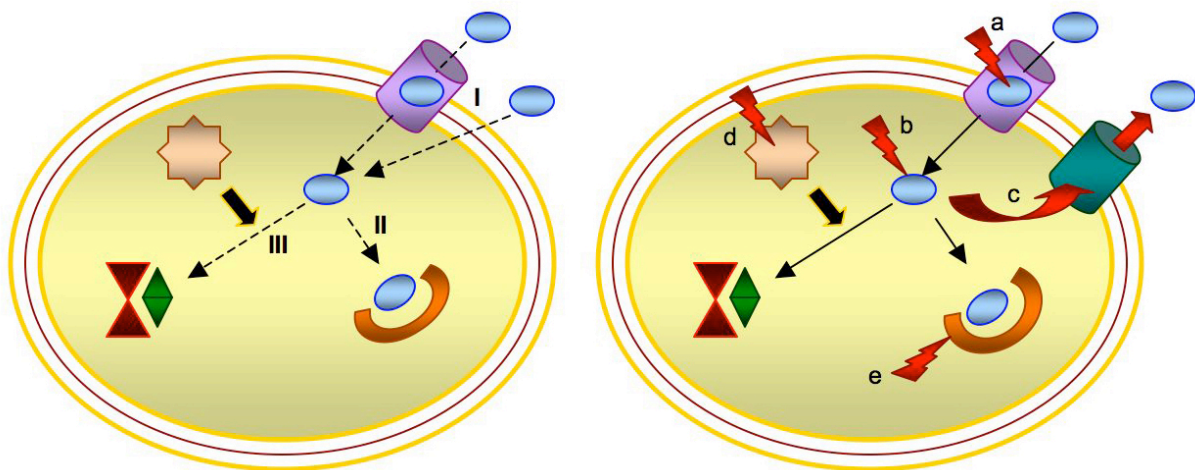


Figura 1: Mecanismos de acción de los antibióticos (Izquierda). Mecanismos de resistencia a los antibióticos (Derecha). Adaptado de Baquero y cols., 2002 (20) . Los diferentes mecanismos se explican en el texto.

La resistencia a los antibióticos puede deberse, bien a la adquisición de genes de resistencia (esencialmente codificando enzimas inactivantes o transportadores) que provienen de otro microorganismo (74, 76), bien a mutaciones (218) que afecten a los genes implicados en alguna de las diversas etapas necesarias para la actividad del antibiótico (Figura 1). De esta forma una bacteria puede hacerse resistente a los antibióticos porque éstos no puedan entrar debido a mutaciones en los transportadores, o por mutaciones que impidan que éstos se sinteticen (a). Puede suceder que haya enzimas que lo inactiven (b) o que existan sistemas capaces de expulsar los antibióticos (c). También puede hacerse resistente si existen mutaciones que afecten a las enzimas intracelulares necesarias para la activación del antibiótico, en caso de que éste se suministre como pre-antibiótico (d). Por último, una mutación que afecte al blanco del antibiótico puede hacer que éste no lo reconozca (e). (20)

1.2 Efectos de la resistencia en la fisiología bacteriana

Está generalmente aceptado que la adquisición de resistencia a los antibióticos produce un impacto global en el metabolismo de la bacteria (coste biológico o pérdida de *fitness*), haciendo que la bacteria sea menos competitiva que la cepa isogénica sensible. Esta idea está basada en el hecho de que las mutaciones que conducen a la resistencia se producen en genes que son importantes para la fisiología de la bacteria. Una modificación de las proteínas diana debería causar una pérdida de su función normal, conduciendo a un metabolismo bacteriano menos eficiente (12, 13). Igualmente, la adquisición de genes de resistencia mediante HGT, debido, por ejemplo, a la transferencia de un plásmido, podría estar asociado con un coste metabólico debido a la replicación, transcripción y traducción de los genes presentes en el nuevo replicón (36). Este coste se reflejaría en una reducción de la tasa de crecimiento.

Sin embargo, algunos autores defienden que el efecto de la resistencia a los antibióticos en la fisiología de la bacteria es más complejo y específico de lo que previamente se pensaba. Por ejemplo, se ha demostrado que el coste de la resistencia a los antibióticos no tiene por qué ser igual *in vivo* que *in vitro* (128), o que la misma mutación de resistencia a los antibióticos puede mostrar efectos contrarios en dos cepas distintas de la misma especie bacteriana (207). Luo y cols., en 2005 llevaron a cabo estudios de infección *in vivo* en aves colonizadas por el patógeno *Campylobacter jejuni*. En dichos análisis, la misma mutación en el gen *gyrA*, que codifica la subunidad A de la girasa y confiere resistencia a quinolonas, tenía efectos contrarios en dos

cepas de *C. jejuni*: aumento de persistencia en el pulmón para unos y disminución de *fitness* en otros. Como ya se ha comentado, las mutaciones que producen resistencia a los antibióticos aparecen en genes que normalmente juegan un papel importante en la fisiología de la bacteria. Los productos de estos genes forman parte de unas redes reguladoras y metabólicas altamente complejas e integradas. Las modificaciones en sus actividades pueden alterar el metabolismo de la célula. Sin embargo, estos cambios derivados de la adquisición de resistencias a los antibióticos no son necesariamente manifestadas por una reducción generalizada del *fitness* bacteriano para todos los ambientes posibles. De este modo, cabría esperar un cierto grado de especificidad, e incluso ganancia de *fitness*. Por ejemplo, un mutante en *Stenotrophomonas maltophilia* que sobreproduce el sistema de bombeo múltiple de Drogas (*Multidrug Resistance*, MDR) SmeDEF es menos virulenta sobre *Dyctiostelium discoideum*, pero es más eficiente a la hora de utilizar ciertos azúcares y otros compuestos como fuentes de carbono (6). Otro ejemplo es la aparición de resistencia a rifampicina debida a mutaciones en el gen *rpoB* que codifica la subunidad β de la ARN polimerasa (352). Maughan estableció en 2004, que los cambios que se producen en este gen, y que le confieren a *Bacillus subtilis* resistencia a rifampicina, conllevan una alteración en la función de la polimerasa, que ya no se une correctamente a ciertos promotores. De este modo se producirían variaciones importantes en el fenotipo de la bacteria que podrían suponer un coste biológico (224). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que algunos mutantes resistentes a rifampicina mostraban tasas de crecimiento inferiores en medio rico, pero en cambio dichos mutantes eran capaces de usar β -glucósidos, y nutrientes presentes en el suelo de forma más efectiva que los individuos sensibles (272). Esto indica que el “coste de *fitness*” es dependiente del ecosistema en que se encuentre la bacteria resistente.

Lo mismo sucede con los cambios en el metabolismo que pueden producirse por la adquisición de resistencias debido a fenómenos de HGT. Aunque en algunas ocasiones la expresión de genes de resistencia adquiridos por HGT son regulados por elementos presentes en el cromosoma de la célula receptora (83), otras veces están bajo el control de promotores constitutivos (49, 135, 293). Así, estos genes no se encuentran bajo el mismo sistema regulador de los hospedadores originales. En tales circunstancias, puede producirse una alteración metabólica global. De hecho, se ha demostrado que la adquisición de plásmidos produce un cambio metabólico que rápidamente es compensado con mutaciones en el cromosoma y en el propio plásmido (36).

Sin embargo, en otras ocasiones, los efectos son más específicos. Por ejemplo, se ha encontrado que la expresión de la β -lactamasa AmpC, codificada en un plásmido, conduce a una reducción de la tasa de crecimiento y de la invasividad de *Salmonella enterica* serotipo *Typhimurium* (244). Estos cambios no se observan cuando el plásmido también contiene el represor de *ampC*, AmpR; ni cuando se expresa otra β -lactamasa, indicando que los cambios metabólicos no son consecuencia de la carga metabólica de la replicación del plásmido. Es, por tanto, claro que la producción de AmpC específicamente reduce la invasividad de *S. enterica*.

Este es un claro ejemplo de que en el caso de las bacterias patógenas, un cambio en el *fitness*, podría también afectar a su virulencia. Dado que, al menos en la sociedades desarrolladas, los individuos infectados se encuentran habitualmente bajo tratamiento, la interconexión entre resistencia a los antibióticos y la virulencia es un elemento importante para comprender en profundidad el proceso infectivo (217).

1.3 Relación entre la resistencia a los antibióticos y la virulencia bacteriana

Como se ha indicado con anterioridad, es importante plantearse si la adquisición de resistencia puede producir cambios en la virulencia de los patógenos bacterianos. De hecho,

diversos trabajos han demostrado que, al menos en ciertas ocasiones, la virulencia de las bacterias resistentes a los antibióticos está disminuida.

A mediados del siglo XX se observó que las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a isoniazida eran menos virulentas que las cepas parentales en modelos animales (238). Aunque este trabajo se ha citado como evidencia de que la adquisición de resistencia a isoniazida atenúa *M. tuberculosis*, se ha visto posteriormente que las cepas con resistencia a isoniazida son heterogéneas en términos de resistencia y patogenicidad (202, 263)

Se ha visto también que mutantes de *S. typhimurium* resistentes a estreptomycin, rifampicina o ácido nalidíxico pueden ser avirulentos en modelos de infección en ratón. Estos mutantes avirulentos son capaces de acumular mutaciones compensatorias que restauran la virulencia sin pérdida significativa de resistencia (31). Más recientemente, Bjorkman y cols., en 2000, abordaron un estudio con el fin de analizar si el coste de la resistencia era compensado por mutaciones diferentes bajo distintas condiciones de crecimiento. Examinaron dos tipos de resistencia a los antibióticos en la cepa LT2 de *S. typhimurium*: resistencia a estreptomycin (Sm^R) y resistencia a ácido fusídico. Los datos obtenidos demuestran que las diferentes mutaciones compensatorias que se producen en los mutantes Sm^R son debidas a las distintas condiciones de crecimiento analizadas (*in vitro* en laboratorio o *in vivo* en el modelo animal). Este hallazgo implica que la naturaleza de los cambios compensatorios depende del ambiente, lo que sugiere que la evolución para compensar la pérdida de *fitness* causada por mutaciones de resistencia o por otras alteraciones, tales como las asociadas con la colonización y la virulencia, podría ocurrir por mecanismos diferentes dentro y fuera del hospedador. En términos generales, la evolución molecular podría seguir diferentes trayectorias por el ambiente específico y la influencia que éste ejerce en la selección de distintos tipos de mutantes en los diferentes *hábitats* bacterianos.

Estudios de nuestro laboratorio (6, 205, 296, 302) y de otros (175, 275), han demostrado que los sistemas MDR podrían estar implicados tanto en resistencia a antibióticos como en virulencia bacteriana. Sánchez y cols., en 2002, estudiaron la sobreproducción de determinantes de sistemas MDR MexAB-OprM y MexCD-OprJ en *Pseudomonas aeruginosa*, y vieron que disminuía la supervivencia de dichos mutantes en agua. Además tenían disminuida la producción de fenazinas y proteasas, así como la virulencia en el modelo de infección en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (296). En contraste, la capacidad de formación de *biofilms* no estaba alterada. Usando un modelo de virulencia bacteriana en *D. discoideum*, Alonso y cols., en 2004, encontraron que la sobreexpresión de otro sistema MDR, SmeDEF, está asociada con la reducción de virulencia en *Sthenotrophomonas maltophilia* (6). Linares y cols., en 2005, vieron que la sobreexpresión de determinados sistemas MDR (MexEF-OprN o MexCD-OprJ, pero no MexXY o MexAB-OprM) estaba asociada a una disminución de la inducción del Sistema de Secreción Tipo III (T3SS) y de la citotoxicidad independientemente de la respuesta *Quorum-Sensing* (QS) (205). Esto indica que la adquisición de resistencia como consecuencia de la sobreexpresión de un sistema MDR produce cambios específicos en la fisiología bacteriana.

Como se ha mencionado anteriormente la sobreproducción de sistemas MDR reduce la virulencia de *P. aeruginosa*, por lo menos en modelos animales de infección aguda (55, 148). Sin embargo, *P. aeruginosa* produce también infecciones crónicas y los factores de virulencia requeridos para producir infección crónica y aguda son diferentes (129, 360). Los aislados de infecciones agudas son normalmente más citotóxicos y producen una gran cantidad de proteasas y sideróforos pero no tienen capacidad para formar *biofilms*. Por el contrario, la evolución de *P. aeruginosa* durante la infección crónica hace que aparezcan cepas con un fenotipo opuesto (216). Mutantes sobreproductores de MexCD-OprJ con baja sensibilidad a los antibióticos, producen solo pequeñas cantidades de proteasas y son defectuosos en T3S (fenotipo observado en cepas de *P. aeruginosa* involucradas en infecciones crónicas). Se ha demostrado que las causas de

resistencia a quinolonas en *P. aeruginosa* procedentes de pacientes con infecciones agudas, normalmente son mutaciones en genes de topoisomerasas, mientras que mutaciones en los elementos reguladores de los sistemas MDR se seleccionan con frecuencia en infecciones crónicas (144, 160). Además, en terapias antibióticas experimentales con ciprofloxacina en animales infectados con *P. aeruginosa* se seleccionan mutantes sobreproductores de MexCD-OprJ (211). Aunque estos resultados no son del todo concluyentes, sugieren que las cepas de *P. aeruginosa* sobreproductoras de esta bomba de expulsión podrían estar mejor adaptadas que otros mutantes resistentes a antibióticos a la infección crónica.

Los ejemplos citados anteriormente son una muestra de que existen redes que interconectan la resistencia a los antibióticos y la virulencia bacteriana. Como base para la realización de este trabajo, nos hemos centrado en la búsqueda de genes implicados simultáneamente en ambos procesos. Para ello, utilizamos *P. aeruginosa* como modelo. Como se detalla a continuación, esta especie bacteriana es un patógeno oportunista intrínsecamente resistente a los antibióticos y uno de los mayores responsables de las infecciones en el ámbito hospitalario (279).

1.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Los patógenos oportunistas son microorganismos que infectan a personas con una patología previa, pero raramente producen infecciones en la comunidad (340). Entre los patógenos oportunistas más importantes en el desarrollo de infecciones hospitalarias se encuentra *Pseudomonas aeruginosa* (279, 334). Es un bacilo Gram-negativo ubicuo que se aísla con frecuencia de muestras de suelo y agua y también a partir de muestras de origen clínico como heridas, quemaduras, infecciones del tracto urinario o en pacientes con SIDA. La infección por *P. aeruginosa* es, por otro lado, la causa más importante de mortalidad y morbilidad en individuos aquejados de Fibrosis Quística (FQ), que es la enfermedad hereditaria de mayor prevalencia en la población caucásica (126).

Una de las características principales de *P. aeruginosa* es su baja sensibilidad a los antibióticos (123, 137, 139). Es importante destacar que *P. aeruginosa* es un organismo de vida libre capaz de sobrevivir en distintos ambientes (335). Además, se ha demostrado que esta especie bacteriana utiliza los mismos determinantes de virulencia para infectar distintos organismos, desde plantas hasta humanos (280) y que las cepas infectivas y ambientales son equivalentes tanto a nivel genómico (243, 375) como fisiológico (7). Todo esto indica que los diferentes fenotipos relevantes para la infección por *P. aeruginosa*, incluyendo su baja sensibilidad a los antibióticos, han sido seleccionados en el ambiente natural lejos de su contacto con el hombre.

Eso no significa que *P. aeruginosa* no adquiera resistencia bajo presión selectiva. De hecho, la aparición de mutantes resistentes durante el tratamiento antibiótico es frecuente, situación que viene favorecida por la presencia de bacterias hipermutadoras. Los hipermutadores aparecen frecuentemente en la población bacteriana y se seleccionan, posiblemente por procesos de selección de segundo orden, bajo condiciones de estrés, como la infección crónica (262), o en presencia de antibióticos (210). La presencia de estos hipermutadores incrementa la probabilidad de adquisición de resistencias (210). Otro de los mecanismos para la adquisición de resistencia es el mediado por los integrones. Los integrones son unidades de captura génica que favorecen la adquisición de ADN exógeno y su incorporación en el cromosoma de la bacteria mediante recombinación (135, 153, 292). Aunque no se ha demostrado que puedan transferirse independientemente, la frecuente localización de los integrones en plásmidos y transposones, hace que jueguen un papel muy importante en la diseminación de genes de resistencia a los antibióticos (49, 293).

Se ha sugerido que la resistencia intrínseca a los antibióticos de *P. aeruginosa* es debida a la baja permeabilidad de la envuelta bacteriana y a la actividad de los sistemas MDR (253). Sin embargo, al comienzo de este trabajo no se había realizado una búsqueda exhaustiva de otros tipos de genes involucrados en la resistencia intrínseca a los antibióticos. En el trabajo presentado en esta memoria, se ha llevado a cabo un análisis de genes implicados simultáneamente en la resistencia y la virulencia de *P. aeruginosa*. Los datos obtenidos son importantes para predecir y combatir la resistencia y para avanzar en la comprensión del papel funcional y ecológico de los determinantes de resistencia en los ecosistemas naturales.

P. aeruginosa es un patógeno que contiene un amplio genoma que codifica muchos factores de virulencia diferentes, así como sistemas de regulación que le permiten adaptarse fácilmente a todo tipo de ambientes. Estos determinantes de virulencia son tanto asociados a la célula (flagelo, pili, lipopolisacárido), como extracelulares (elastasas, exotoxina, fosfolipasas, proteasa, lipasa, exoenzimas, alginato, piocinania, sideróforos, ácido cianhídrico y ramnolípidos). Otro de los factores de virulencia extracelulares de *P. aeruginosa* es el T3SS. En la Figura 2 se detallan los diferentes factores de virulencia asociados a *P. aeruginosa*.

1.4.1 Factores de virulencia adheridos a la superficie celular bacteriana

Flagelo: el flagelo es la principal estructura que da movilidad a *P. aeruginosa*. Interviene tanto en el movimiento tipo *swimming* como *swarming*. Tiene un papel crítico en la adhesión de la bacteria a la superficie de la célula epitelial (104). También participa en virulencia, puesto que desarrolla una respuesta inflamatoria dependiente de NFκB a través de la interacción con receptores tipo Toll (TLR5 y TLR2) en la célula eucariota (1, 87). Al ser una estructura muy inmunogénica, es frecuente que se seleccionen mutantes de *P. aeruginosa* que carecen de flagelo en pacientes con infecciones crónicas, de modo que se evade la respuesta del hospedador (212).

Pili: los pili o fimbrias son apéndices filamentosos, más pequeños que los flagelos, situados en la superficie de la bacteria. Estas estructuras le permiten a *P. aeruginosa* llevar a cabo un tipo de movimiento llamado *twitching* (también están implicados en la motilidad tipo *swarming*). La motilidad tipo *twitching* le permite a la bacteria su rápida diseminación por superficies abióticas así como en el epitelio de las vías respiratorias (223). Como los flagelos, los pili son importantes en la fase de colonización ya que intervienen en el proceso de adhesión de la bacteria a la membrana de la célula eucariota (133, 134). En modelos animales de infección pulmonar en ratones recién nacidos las cepas de *P. aeruginosa* que presentan esta estructura en su superficie causan una neumonía más severa que los mutantes carentes de pili (345).

Lipopolisacárido (LPS): la cara externa de la membrana externa de *P. aeruginosa* está principalmente compuesta por LPS. El LPS está formado por tres dominios unidos covalentemente: Lípido A (endotoxina), responsable de las respuestas agudas durante la infección por bacterias Gram-negativas, un núcleo, formado por oligosacáridos fosforilados que contribuye a la permeabilidad selectiva de la membrana externa, y el antígeno-O, polisacárido compuesto por subunidades repetitivas que se extiende por la superficie celular (290). Entre otros efectos, el LPS induce una fuerte respuesta inflamatoria (17, 376), permite la adherencia de *P. aeruginosa* a superficies inertes (290), puede actuar como ligando en la entrada en la célula eucariota (17, 133) y se han observado cambios en su estructura durante la formación de los *biofilms* (28).

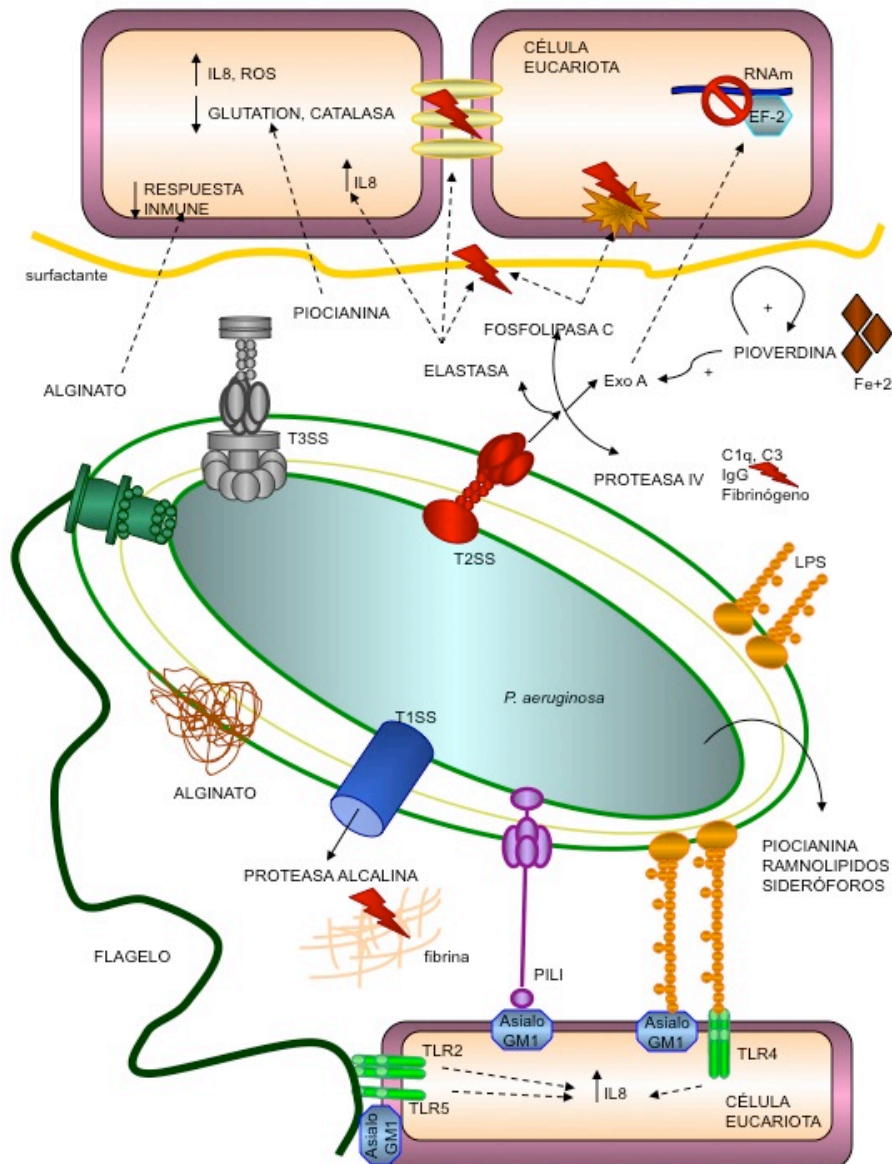


Figura 2: Determinantes de virulencia en *P. aeruginosa*. Tras alcanzar el epitelio respiratorio a través del movimiento tipo "swimming" dependiente del flagelo, y su disseminación mediante el movimiento tipo "twitching" dependiente de los pili, *P. aeruginosa*, se adhiere a las células epiteliales mediante la unión del flagelo, el pili y el LPS al receptor asialoGM1. Las interacciones del flagelo con los receptores TLR2 y TLR5 y del LPS con el receptor TLR4 incrementan los niveles de IL8 mediante la activación de la vía de las MAP quinasas y la vía de NFκB. En pacientes con FQ el alginato aumenta la adhesión y a través de mecanismos aún desconocidos reprime la respuesta del hospedador. La piocianina aumenta los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro del hospedador y dificulta la capacidad antioxidante de la célula eucariota mediante la disminución de los niveles de glutatión y de la inhibición de la catalasa. La piocianina también incrementa los niveles de IL8. La elastasa interrumpe las uniones entre células, destruye las proteínas surfactantes A y D, e incrementa la producción de IL8. La fosfolipasa C lisa los fosfolípidos de la membrana e inactiva el surfactante pulmonar. Los ramnolípidos actúan sinérgicamente con la fosfolipasa C para romper los lípidos de membrana. La exotoxina (ExoA) inhibe el Factor de Elongación 2 (EF2) inhibiendo la síntesis de proteínas. La pioverdina incrementa los niveles de ExoA y de sí misma y contribuye a la captación eficaz de hierro (Fe^{2+}) por parte de *P. aeruginosa*. La proteasa IV degrada componentes del complemento, la IgG, fibrinógeno, plasmina y plasminógeno. Adaptado de Kipnis y cols., 2006 (172).

1.4.2 Factores de virulencia secretados

1.4.2.1 Factores de virulencia secretados vía Sistema de Secreción Tipo I (T1SS)

Proteasa alcalina: es una metaloproteasa que lisa fibrina. Su expresión está regulada por QS (120). Aunque su patogenicidad sólo se ha demostrado en infecciones de córnea (155) como

para la mayoría de las proteasas de *P. aeruginosa*, puede participar en la patogénesis de infecciones agudas de pulmón. Se ha demostrado que degrada componentes del complemento, IFN γ , y TNF α (154, 268), además de fibrina y fibrinógeno (322). Las cepas de *P. aeruginosa* deficientes en proteasa alcalina son menos virulentas que las que sí la producen, pero aún no está determinado su papel en la invasión tisular y las infecciones sistémicas (147).

1.4.2.2 Factores de virulencia secretados vía Sistema de Secreción Tipo II (T2SS)

Proteasa IV: pertenece al grupo de las serín proteasas. Degrada los componentes C1q y C3 del complemento, la IgG, el fibrinógeno, la plasmina y el plasminógeno (99). La producción de PrpL (cuyo extremo N-terminal es idéntico al de la proteasa IV) es regulada por el factor sigma alternativo PvdS, así mismo regulado por el regulador global de adquisición de hierro Fur (378). PrpL rompe la unión del hierro a la proteína lactoferrina y transferrina de la célula eucariota, y también hidroliza la caseína y la elastina. La degradación de las proteínas que unen hierro ha sido observada durante infecciones crónicas de pacientes de fibrosis quística (39). A su vez, también se ha demostrado su papel en la patogénesis de keratitis por *P. aeruginosa*. Degrada proteínas surfactantes A, D y B por lo que se la relaciona con procesos de infecciones crónicas de pulmón (378).

Elastasa: la elastasa es una metaloproteasa. La capacidad de *P. aeruginosa* para destruir la elastina se considera uno de los mayores determinantes de virulencia de *P. aeruginosa* durante la infección aguda. La elastina es una proteína que se encuentra en el tejido pulmonar de humanos y es fundamental para la correcta contracción y expansión de los pulmones. Además es un importante componente de los vasos sanguíneos. A través de la destrucción de las uniones intercelulares del epitelio (*gap-junction*), la elastasa incrementa la permeabilidad tisular y facilita el reclutamiento de neutrófilos al foco de infección, por lo que se trata de un factor pro-inflamatorio que aumenta los niveles de IL8 (16). Además disminuye la respuesta inmune del hospedador a través de la lisis de las proteínas surfactantes del tracto respiratorio A y D y del receptor 2 activado por proteasa convirtiéndolos en sus formas inactivas (5, 93).

Fosfolipasa C: *P. aeruginosa* produce una fosfolipasa C hemolítica y una fosfolipasa C no hemolítica (264). Mientras que para la forma no hemolítica no se ha mostrado actividad patogénica, la fosfolipasa C hemolítica induce permeabilidad vascular, daño en órganos y muerte en modelos animales (26). Sus dianas son los fosfolípidos de las membranas de las células eucariotas. Se ha demostrado que participa tanto en los procesos de infección aguda (377) como en inflamación (176). Como la elastasa, parte de su patogenicidad reside en la inactivación de surfactantes (152). Además puede suprimir la respuesta oxidativa de neutrófilos (347).

Exotoxina A: la exotoxina A (ExoA) es una ADP-ribosil transferasa que inhibe el Factor de Elongación 2 (EF-2) inhibiendo el proceso de síntesis proteica y llevando a la muerte celular (136, 373). Se ha demostrado su capacidad de inhibición de la respuesta del hospedador durante la infección (311). Dentro de las toxinas extracelulares, la exotoxina A tiene un papel fundamental en la virulencia de *P. aeruginosa* (242) aunque en menor proporción que efectores del T3S como ExoS (179). Los mutantes carentes de exotoxina A son menos virulentos que la cepa silvestre (242).

1.4.2.3 Otros factores de virulencia secretados

Piocianina: pertenece al grupo de las fenazinas. Es un pigmento azul secretado por *P. aeruginosa*. Se ha demostrado que tiene numerosos efectos patogénicos como son el incremento de los niveles de la citoquina pro-inflamatoria IL-8 (82, 198), la supresión del sistema inmune (9, 198) y la inducción de apoptosis en neutrófilos (9). La piocianina es esencial en la virulencia de *P. aeruginosa* durante infecciones crónicas y agudas (191) y produce un aumento del número de

neutrófilos reclutados al foco de infección. Debido a sus propiedades oxido-reductoras, la piocianina es reducida por el NAD(P)H de la célula, y el pigmento reducido reacciona con el oxígeno molecular e induce la formación de radicales superóxido y peróxido de hidrógeno. Igualmente puede oxidar el glutatión de la célula eucariota e inhibe la actividad de la catalasa en las células epiteliales, de modo que les induce un fuerte estrés oxidativo (256, 257).

Sideróforos: en condiciones limitantes de hierro, *P. aeruginosa* secreta pioverdina y pioquelina que compiten por el hierro con la transferrina de la célula eucariota. Forman complejos hierro-sideróforos que entran de nuevo en la célula bacteriana a través de los receptores específicos (23). La pioverdina regula además la producción de tres factores de virulencia: Exotoxina A, endoproteasa PrpL y la propia pioverdina (187).

Ramnolípidos: las especies de *Pseudomonas* producen dos hemolisinas: fosfolipasa C y ramnolípidos. Se ha propuesto que ambas actúan sinérgicamente para romper lípidos y lecitina. La regulación de su producción es compleja y en ella interviene el sistema QS (213). Tiene un papel importante durante el desarrollo de comunidades microbianas dentro de la estructura del *biofilm*. Las dos hemolisinas contribuyen a la invasión de los tejidos por sus efectos citotóxicos. Se cree que la acción de los ramnolípidos debido a su estructura similar a los detergentes es disolver los fosfolípidos del surfactante pulmonar y hacerlos mas accesible a la acción de la fosfolipasa C (206).

Alginato: es un polisacárido mucóide producido por *P. aeruginosa* y que está formado por la repetición de polímeros de ácido manurónico y ácido glucurónico (131). El alginato, al igual que el LPS, funciona como una adhesina, anclando *P. aeruginosa* al epitelio respiratorio y favoreciendo su colonización. La sobreproducción de alginato protege a *P. aeruginosa* de la fagocitosis, de los antibióticos, e incluso atenúa la respuesta del hospedador. Además forma parte de la estructura del *biofilm* (51, 145).

1.4.3 Sistema de Secreción Tipo III (T3SS)

El T3SS es un sistema ampliamente diseminado entre distintas especies bacterianas que permite inyectar directamente toxinas en el citoplasma de la célula eucariota (157). El T3SS de *P. aeruginosa* es un complejo estructural tipo pili que permite la translocación de efectores desde la bacteria, a través de las membranas bacterianas al interior de la célula hospedadora mediante un apéndice en forma de aguja que forma un poro en la membrana de la célula eucariota (306). Hay cuatro toxinas conocidas, expresadas diferencialmente en las distintas cepas, que *P. aeruginosa* inyecta directamente en la célula hospedadora: ExoY, ExoT, ExoS y ExoU (109). ExoS y ExoT inhiben la fagocitosis impidiendo la reorganización del esqueleto de actina de la célula eucariota e inhibiendo las cascadas de transducción de señales fundamentales para la fagocitosis de la bacteria (22). ExoU y ExoY son citotoxinas con funciones de fosfolipasa y adenilato ciclasa respectivamente (303, 390) (Figura 3).

Utilizando cultivos celulares y modelos de infección animal se ha demostrado la importancia del T3SS en la patogénesis de las infecciones agudas por *P. aeruginosa* (151, 305).

La expresión de los genes de este sistema está muy regulada por las condiciones ambientales. Las dos señales inductoras más estudiadas que inducen la expresión de genes del T3SS son el contacto de *P. aeruginosa* con la célula eucariota y la depleción de calcio del medio extracelular (109). El estrés metabólico, el daño en el DNA, altas concentraciones de Cu^{+2} y un descenso en la osmolaridad del medio son señales represoras de la expresión de los genes del T3SS en *P. aeruginosa* (92, 288).

El regulón T3SS de *P. aeruginosa* está formado por 43 genes regulados coordinadamente que codifican la maquinaria de translocación y secreción, funciones reguladoras, efectores y chaperonas específicas (109) (Figura 3).

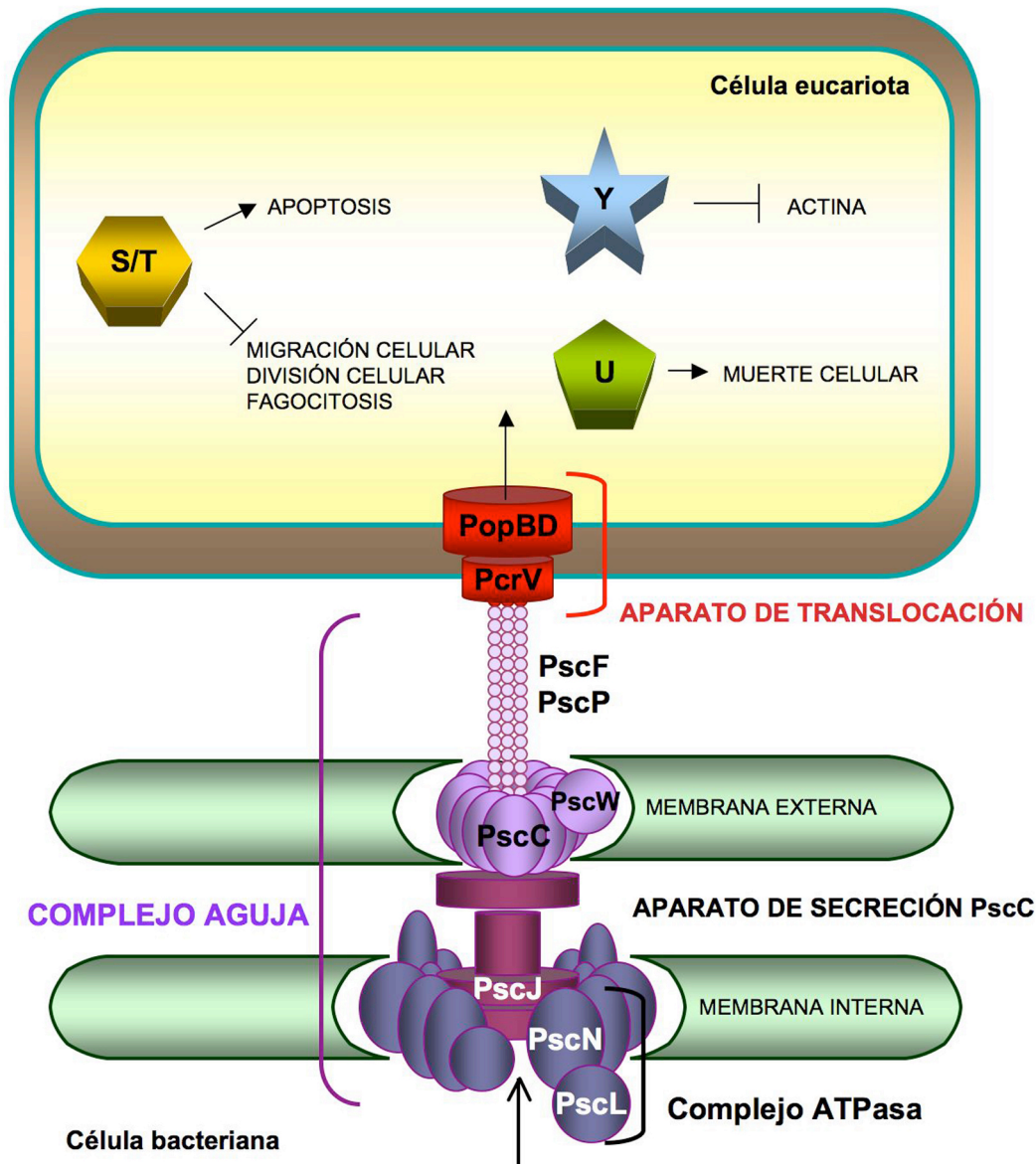


Figura 3: Esquema del T3SS en *P. aeruginosa*. El T3SS está constituido por una aparato de secreción: proteínas PscC, y un aparato translocador (proteínas PopD, PopB, PcrV) que permiten la secreción directamente en el citoplasma de la célula eucariota de las exotoxinas (ExoS, ExoT, ExoY y ExoU). ExoS induce apoptosis, inhibe la migración celular, interrumpe las uniones intercelulares y destruye el citoesqueleto de actina en células epiteliales y endoteliales. Tanto ExoS como ExoT inhiben la fagocitosis en células epiteliales y fagocíticas. Además pueden inhibir las funciones de macrófagos y neutrófilos. ExoS puede inhibir además el tráfico vesicular. ExoU posee una actividad fosfolipasa que induce una muerte celular rápida en muchos tipos celulares. ExoY es una adenilato ciclasa que puede destruir el citoesqueleto de actina. Todos estos efectores juntos inhiben de forma eficiente la reparación del daño tisular y la respuesta inmune por parte del hospedador. Este daño permanente de los tejidos facilita la colonización del hospedador por parte de *P. aeruginosa*. Adaptado de Kipnis y cols., 2006 y Engel y cols., 2009. (98, 172)

Los genes que codifican la secreción (*pcr* y *psc*), translocación (*popB* y *popD*) y la maquinaria de regulación (*exs*) de este complejo sistema están agrupados dentro de cinco operones localizados en el cromosoma de *P. aeruginosa*. Los genes que codifican los efectores y

las chaperonas asociadas están localizados en sitios separados del cromosoma, o en el caso de *exoU* en una isla de patogenicidad (182). Todos los genes del T3SS están bajo el control transcripcional directo del activador ExsA (388). ExsA se auto-regula mediante la activación del operón *exsCEBA*.

El complejo aguja es la estructura responsable para el transporte de las proteínas efectoras desde el citosol de la bacteria hasta el medio extracelular. Este complejo multiproteico en *P. aeruginosa* es similar a los complejos más caracterizados como los de *Yersinia spp.*, *Salmonella enterica* y *Shigella flexneri*. Su estructura se puede dividir en dos partes (Figura 3): una base y un filamento tipo aguja. El filamento está compuesto por subunidades de la proteína PscF (269, 332). Poco más se ha hecho para caracterizar el resto de componentes del complejo aguja de *P. aeruginosa*, aunque algunas funciones se pueden deducir por semejanza de este sistema con el T3SS de *Yersinia spp.* Por ejemplo, se piensa que PscN es la ATPasa del sistema y está regulada por PscL (32, 384). PscC es una proteína tipo secretina que probablemente oligomeriza con la ayuda de la lipoproteína PscW, para formar un canal en la membrana externa de la bacteria (42, 177). Por otro lado, PscP probablemente sea la proteína que regula la longitud del filamento o aguja (164), y se ha predicho que PscJ puede ser un componente lipoproteico de la subestructura basal del complejo aguja (43).

El aparato de translocación forma un poro en la membrana de la célula eucariota que libera las proteínas efectoras secretadas por el complejo aguja directamente en el citoplasma de la célula huésped (Figura 3). Como en *Yersinia spp.*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*, el aparato translocador de *P. aeruginosa* está formado por tres proteínas: PopB, PopD y PcrV (66, 307, 339).

A diferencia de otras especies bacterianas, en *P. aeruginosa* se han identificado sólo cuatro proteínas efectoras: ExoS, ExoT, ExoY y ExoU (Figura 3). En *Yersinia spp.*, el sistema Yop de T3S tiene 6 efectores. En *Salmonella spp.* se han descrito, dependiendo de las especies al menos 10 efectores y en *Shigella flexneri* se han encontrado hasta 25 proteínas efectoras. Aunque la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* poseen los genes que codifican la maquinaria del T3SS, la mayor parte de las cepas carecen de alguno de los genes que codifican los efectores (105, 107). En aislados procedentes de infecciones agudas, el gen *exoS* se encontró en un 58-72% de los aislados, el gen *exoU* en un 28-42%, el gen *exoY* en un 89% y el gen *exoT* en un 92-100%. Por razones que aún se desconocen, casi todas las cepas o tienen el gen *exoS* o tienen *exoU* pero no ambos.

ExoS: es una citotoxina bifuncional con dos dominios activos: un dominio C-terminal ADP-ribosil transferasa y un dominio N-terminal activador de proteína Rho GTPasa (dominio GAP). El papel patogénico de ExoS recae fundamentalmente sobre el dominio C-terminal. La actividad ADP-ribosil transferasa de este dominio produce una desorganización del citoesqueleto en la célula diana (319). Además se ha visto que este dominio C-terminal es capaz de unirse al receptor TLR2 y el dominio N-terminal al receptor TLR4, mostrando que ExoS puede modular la respuesta inflamatoria e inmune del hospedador (100). ExoS y ExoU no se secretan simultáneamente o lo hacen en una prevalencia muy baja en una misma cepa de *P. aeruginosa* (121), de modo que, a pesar de que ExoS es menos citotóxica que ExoU, su alta prevalencia indica que es una citotoxina principal en ciertas estirpes (197).

ExoT: es similar a ExoS ya que presenta una actividad dual ADP ribosil transferasa y actividad GAP. ExoT tiene efectos similares a los de ExoS sobre el citoesqueleto de la célula eucariota, y ha sido demostrado que inhibe tanto la internalización de *Pseudomonas spp.* en células epiteliales y macrófagos (122), como la reparación del tejido epitelial pulmonar dañado (124).

ExoY: es una adenilato ciclasa que incrementa los niveles citosólicos de AMPc (390). Este aumento de la concentración de AMPc induce la formación de espacios intercelulares en la microvasculatura de las vías respiratorias y, por tanto, produce un aumento de la permeabilidad vascular (308).

ExoU: tiene una actividad fosfolipasa/lisofosfolipasa que destruye las membranas de la célula eucariota después de su translocación por el T3SS (304, 343). En modelos de infección aguda de pulmón, se ha visto que, tras la activación de ExoU, por un cofactor eucariota desconocido, se produce una respuesta inflamatoria generalizada y septicemia (11, 319). En pacientes infectados con cepas que expresan ExoU el riesgo relativo de mortalidad se incrementa aproximadamente de 2 a 3 veces (294).

1.4.3.1 Control de la expresión génica del T3SS en *P. aeruginosa*

El inyectosoma bacteriano es una estructura similar al flagelo y consiste en una estructura basal, un aparato de secreción asociado y un filamento tipo aguja que sale desde la superficie celular y sirve como un conducto a través del cual las proteínas son secretadas (35). Como en el flagelo, el ensamblaje del inyectosoma se produce de forma secuencial empezando con la estructura basal y finalmente con la formación del aparato secretor y la aguja distal (54). La actividad secretora está extremadamente regulada y depende de señales activadoras específicas. La más relevante es el contacto de la bacteria con las células dianas eucariotas. Tras el contacto se producen tres eventos: 1.- secreción de las proteínas translocadoras que forman el poro en la membrana plasmática de la célula diana, 2.- translocación de las proteínas efectoras preformadas en la célula diana; y 3.- aumento de la expresión de los genes relacionados con el inyectosoma (96, 108, 391). En ausencia de condiciones de inducción, el regulón del T3SS de *P. aeruginosa*, se expresa a niveles basales, posiblemente de 1-2 inyectosomas por célula (288) (Figura 4).

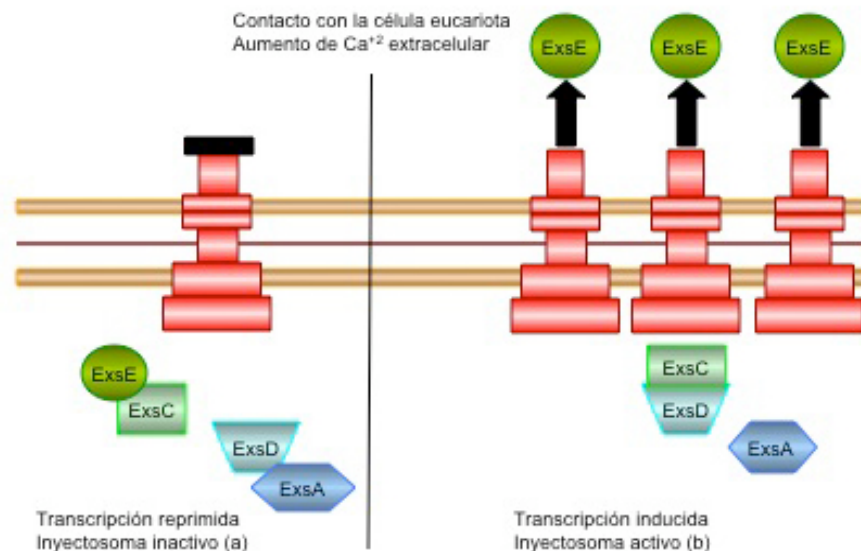


Figura 4: Control de la expresión génica del T3SS en *P. aeruginosa*. (a) ExsD es un anti-activador que se une e inhibe la transcripción dependiente de ExsA (227). ExsC actúa como un anti-anti-activador al unirse e inhibir la actividad reguladora inhibidora de ExsD (71). ExsC también sirve como una chaperona del T3SS para ExsE (289, 355). (b) La activación del inyectosoma por el contacto con la célula eucariota conduce a la translocación de ExsE resultando en un correspondiente descenso de la concentración citoplasmática de ExsE (354). Como consecuencia de estos niveles reducidos de ExsE, se libera la chaperona ExsC, que se a su vez une y secuestra el anti-activador ExsD, de modo que ExsA que está libre es capaz de activar la transcripción del sistema entero. Adaptado de Brutinel y cols., 2008 (41).

La activación del inyectorio de *P. aeruginosa* produce la expresión del sistema completo incluyendo los genes que codifican efectores, translocadores, reguladores, chaperonas y proteínas estructurales del inyectorio (391). Estos genes están bajo el control transcripcional de ExsA. La transcripción dependiente de ExsA está unida a la actividad secretora del inyectorio mediante una cascada de interacción de tres proteínas: ExsC, ExsD y ExsE tal y como se detalla en la Figura 4.

Tanto el descenso de los niveles de Ca^{+2} como el contacto con la célula eucariota activan la cascada de regulación ExsCEDA. Sin embargo, existen otros mecanismos de control transcripcional del T3SS. Estudios recientes han demostrado que las mismas condiciones que inducen la expresión del T3SS también inducen la expresión de la ciclase CyaB (329, 385), y consecuentemente se aumentan los niveles de AMPc. Los niveles de AMPc regulan la expresión de genes en *P. aeruginosa* mediante la activación del regulador Vfr, que produce a su vez una inducción del T3SS (385). Por otro lado, estudios recientes han ligado la regulación negativa del sistema T3SS con la regulación de factores que contribuyen a la infección crónica en pacientes de fibrosis quística. Estos factores incluyen el alginato, los *loci pel* y *psl* involucrados en la biosíntesis de polisacáridos y la formación de *biofilm*, y el QS (65, 67, 328). Otra red de regulación que afecta al T3SS es la vía regulada por las proteínas sensoras RetS (inhibidor del T3SS) y LadS (activador del T3SS). Las actividades reguladoras de ambas proteínas están mediadas a través de la vía GacS/GacA/*rsmZ* (360). RetS/LadS/GacSA regulan la expresión de los genes del T3SS a través de la vía de AMPc/Vfr (248). Por último el factor sigma de fase estacionaria *rpoS* parece estar también implicado en el control del T3SS mediante la regulación del sistema Rhl de QS (150, 371).

1.4.4 Quórum-sensing (QS)

El sistema QS es un complejo mecanismo que regula la expresión de un gran número de genes en *P. aeruginosa*. Clásicamente se ha definido como un sistema de regulación dependiente de densidad de población y que está mediado por la secreción de moléculas señal. Estos componentes de bajo peso molecular (autoinductores) regulan la expresión de los genes diana de QS una vez que han alcanzado una concentración determinada. Este sistema permite a las células controlar de forma colectiva la expresión genética y sincronizar el comportamiento de la población bacteriana (361, 381). Los componentes clave de cualquier “módulo” de QS son la sintasa de la molécula señal, el receptor de la molécula señal y la molécula señal en sí misma (381). Sin embargo, la comunicación bacteriana célula-célula no sucede sólo en densidades de población elevadas y algunos autores han adoptado el término QS también para la descripción de cualquier tipo de comunicación intercelular que involucre moléculas señal difusibles. Estas moléculas señal pueden actuar con receptores en la superficie celular o bien con receptores internos tras su entrada en la célula diana (361, 381).

El sistema QS se descubrió hace más de una década en el organismo *Vibrio fischeri* (97, 113), y desde entonces se ha descrito en diferentes especies bacterianas. En bacterias Gram-negativas las moléculas señal son en su mayoría acil-homoserín lactonas (AHLs). En bacterias Gram-positivas, la señalización se produce mediante péptidos. Además hay un autoinductor conocido con el nombre de AI-2 que se ha propuesto como una señal universal para la comunicación interespecies (79, 370).

En bacterias Gram-negativas, hay dos proteínas importantes que están involucradas en la regulación del sistema QS (113): una proteína R, que es el regulador transcripcional homólogo a LuxR de *V. fischeri*, y una proteína I, que es la sintasa del autoinductor que es homólogo de LuxI que es la que sintetiza la molécula señal que normalmente es una AHL.

Las AHLs, sintetizadas a niveles basales, son secretadas al medio extracelular donde se acumulan durante el crecimiento bacteriano. Cuando la concentración de AHLs alcanza un determinado valor se une a su proteína R correspondiente. La unión activa el regulador transcripcional R, que se une a secuencias específicas del DNA en la región promotora de sus genes diana y activa la transcripción de los mismos. En la mayoría de los sistemas caracterizados el gen I es diana del producto del gen R y se transcribe rápidamente dando lugar a la síntesis de más autoinductor que se acumula y aumenta la señal. La amplificación de la señal hace que todos los genes dianas de la proteína R estén regulados en respuesta al autoinductor (327). En consecuencia, las repuestas intracelulares se sincronizan (327). Los procesos fisiológicos regulados por QS son muy variados y a menudo están relacionados con la virulencia en bacterias patógenas (316, 359, 363).

En *P. aeruginosa*, se han identificado dos sistemas completos de QS: el sistema Las (LasR como proteína R y LasI como proteína I) junto con su señal autoinductora 3-oxo-C12-HSL, y el sistema Rhl (RhIR como proteína R y RhII como proteína I) junto con su señal C4-HSL (190, 314). Además existe otra molécula distinta de las AHLs denominada PQS (*Pseudomonas* Quinolone Signal), que también forma parte de este complejo sistema (231, 273) (Figura 5).

En *P. aeruginosa* el sistema QS juega un papel fundamental en la producción de factores de virulencia, maduración del *biofilm*, motilidad tipo *swarming* y la expresión de bombas de expulsión de drogas. Además, está implicado en el desarrollo de las interacciones patógeno-hospedador. Los sistemas *las* y *rhl* regulan directa o indirectamente la expresión de un 10% de los genes de *P. aeruginosa* (314) y están organizados jerárquicamente de modo que LasR/3-oxo-C12-HSL dirige la expresión de *lasI* así como la expresión de *rhIR* y *rhII* (190). La molécula 3-oxo-C12-HSL se mantiene en unos niveles relativamente constantes (393), gracias a la acción contraria del represor transcripcional RsaL. RsaL reprime la transcripción de *lasI* y *rsaL*. LasR y RsaL no compiten por el mismo sitio de unión, si no que se unen a zonas adyacentes del cromosoma, de modo que cuando ambos están unidos a sus promotores correspondientes predomina la acción de RsaL sobre LasR (282). Además RsaL se une directamente a promotores de genes diana de QS como el promotor del operón de piliocianina, modulando, por tanto, la actividad de QS tanto directa como indirectamente (282). Por otro lado, los niveles de 3-oxo-C12-HSL pueden estar regulados por la acción de acilasas de AHL de cadena larga de *P. aeruginosa* como son PvdQ y QuiP (156, 326).

Aunque se ha establecido una jerarquía, hay que destacar que algunos genes son específicos de la vía *las*, otros responden mejor a las dos AHLs que a 3-oxo-C12-HSL sola, algunos responden a ambas pero no a 3-oxo-C12-HSL sola y otros son específicos de la vía *rhl* (314). Estas diferencias de reconocimiento de los promotores diana por LasR/3-oxo-C12-HSL y RhIR/C4-HSL depende de cómo estén conservadas las cajas *las-rhl* que funcionan como sitios de unión para uno o ambos reguladores (313).

La expresión de *lasR*, *lasI*, *rhIR* y *rhII* varía ampliamente dependiendo del medio en el que estén creciendo las bacterias. La expresión de estos genes en medio mínimo o diluido es mayor que en medio rico. El momento de expresión de estos genes también ocurre más temprano y en mayores proporciones en LB diluido que en LB rico (91). En muestras de esputos de pacientes con FQ, en condiciones de disminución de niveles de hierro y limitación de oxígeno también se han observado diferencias en los niveles de la expresión de las vías *las-rhl*. Bajo ciertas condiciones la máxima activación del sistema *las* precede al de *rhl*, mientras que para otras condiciones de crecimiento, *rhl* es activado más temprano que el sistema *las* (91).

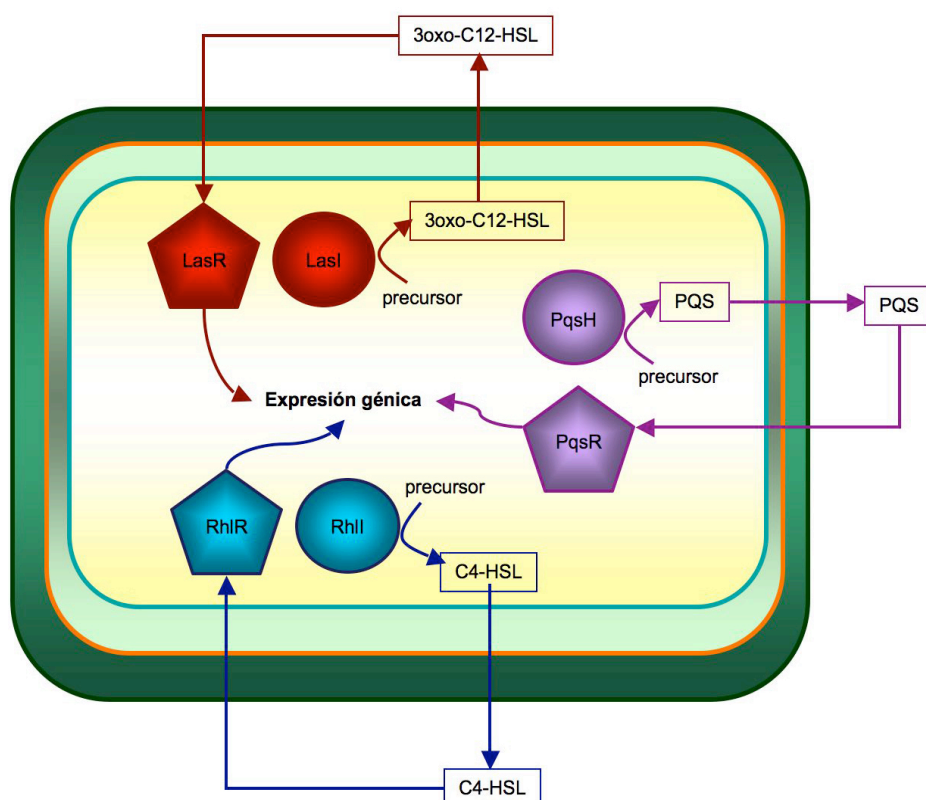


Figura 5: Sistema QS en *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* secreta dos autoinductores del tipo de las homoserín lactonas, sintetizados por homólogos de LuxI: LasI y RhlI. Estas señales son reconocidas por sus reguladores correspondientes LasR y RhlR. Otro sistema QS es el que sintetiza PQS mediante una monooxigenasa no relacionada con LuxI: PqsH. Esta señal sale de la célula dentro de vesículas y posteriormente es reconocida por su regulador PqsR, también conocido como MvfR. Adaptado de Schertzer y cols. 2009 (310)

Por otro lado, la expresión de ciertos genes (*lasB*, *hcnA*) pero no otros (*lasA*, *lecA*) puede producirse antes que la transcripción de *rhlR* o *lasR*, lo que surge que existen otros genes que llevan un control en la señalización QS sobre la jerarquía *las/rhl* o co-regulan los genes diana de QS junto con *las* y *rhl*. Este es el caso de dos homólogos de LuxR, QscR y VqsR (86, 313).

Como se ha mencionado anteriormente, además de las vías *las* y *rhl*, en el sistema QS de *P. aeruginosa* participa otra molécula denominada PQS. LasR regula la producción de PQS, que, a su vez, es necesaria para activar la transcripción de *rhlR* y *rhlI*, creando una unión reguladora entre ambas vías (231, 273). PQS es un derivado del antranilato (45) sintetizada por las proteínas codificadas en el operón *pqsABCDEH*. Los genes *pqsABCD* son regulados por PqsR (47), por el contrario, *pqsH* está activado por *lasR* en conjunción con el autoinductor 3-oxo-C12-AHL (119). A su vez, la expresión de PQS está reprimida por RhlR (230). La producción de PQS es máxima en la fase estacionaria tardía de crecimiento (231). Sin embargo, bajo determinadas circunstancias se produce al principio de la fase estacionaria y es independiente de LasR (85).

Ambos sistemas *las-rhl*/PQS están íntimamente ligados y la mutación en cualquiera de ellos produce una atenuación de la virulencia de *P. aeruginosa*.

En *P. aeruginosa* los sistemas Las y Rhl están regulados positivamente por el regulador de respuesta de dos componentes GacA, que es un regulador global que se requiere para la producción de diversos factores de virulencia (285). Igualmente la síntesis de QscR está también activada por GacA (193). En *P. aeruginosa*, la adenilato ciclasa CyaB, su producto, cAMP y el regulador transcripcional dependiente de cAMP, Vfr, constituyen una importante red reguladora

implicada en la regulación de la expresión de aproximadamente 100 genes. Vfr, homólogo de CRP (*catabolite repression protein*), responde al estado metabólico y energético de la célula (329, 385) y controla la expresión génica de *lasR* y *rhIR*(4, 234).

Otras proteínas implicadas en la regulación de este sistema son: AlgR2 (AlgQ) (192), RpoS (315, 371), RmsA(274), MvaT (86).

1.4.5 Formación de *biofilms* y motilidad en *P. aeruginosa*

Los *biofilms* bacterianos son estructuras formadas por organismos adheridos a una superficie que dan lugar a comunidades altamente diferenciadas dentro de una matriz extracelular (56) compuesta de polisacáridos (298), ácidos nucleicos (10, 369) y proteínas. La transición desde bacterias creciendo en medio libre a un modo de vida estático en *biofilms* implica una adherencia inicial de la bacteria a la superficie, seguido por una acumulación de grupos de células y la formación de microcolonias, progresando hasta la formación de grandes macrocolonias. Los *biofilms* juegan un papel fundamental tanto en la colonización de superficies abióticas como de tejidos vivos. La capacidad de formar *biofilms* ha sido considerada un factor de virulencia tanto en *P. aeruginosa* como en otras bacterias (57).

Las estructuras que forman el *biofilm* contienen canales por los que los nutrientes pueden circular llegando a todos los miembros que lo componen (56). En diferentes regiones del *biofilm* las células pueden presentar unos patrones de expresión génica muy distintos (72). Estos *biofilms* pueden disgregarse y liberar individuos móviles que pueden colonizar otras áreas (Figura 6).

Las bacterias que componen el *biofilm* liberan antígenos que estimulan la liberación de anticuerpos. Sin embargo, estos anticuerpos no son efectivos a la hora de eliminar las bacterias situadas dentro del *biofilm*, de modo que se forman inmunocomplejos que producen daños graves en los tejidos circundantes (52). Incluso en individuos sanos es difícil que el sistema inmune por sí solo sea capaz de erradicar un *biofilm* (171).

Los *biofilms* son resistentes a los agentes antibióticos, entre otros motivos, por la dificultad que tienen los antimicrobianos de penetrar en su interior (57). Por otro lado, las bacterias que están dentro del *biofilm* tienen un acceso restringido a los nutrientes por lo que se encuentran en condiciones de crecimiento lento (125), lo que las hace menos sensibles a los antibióticos.

Se han descrito diversos sistemas reguladores implicados en la formación del *biofilm*. Algunos de estos factores son: el factor regulador global de virulencia GacA (267), las proteínas sensoras, LadS y RetS, que actúan bajo el control de GacA, posiblemente regulando el inicio de la formación de los *biofilms* (129, 360). Otra proteína reguladora de la formación de *biofilms* es AlgR. Se trata de un regulador de respuesta requerido para la síntesis de alginato. El alginato es el principal componente de la matriz de *biofilms* en pulmones de pacientes con fibrosis quística (131). Mutantes en *algR* tienen disminuida tanto su capacidad de movimiento dependiente de pili tipo IV como la formación de *biofilms* (369). El sistema de tres componentes SadARS, que regula la formación de microcolonias maduras (178), y PvrR, un regulador de respuesta involucrado en el cambio de células en crecimiento libre al *biofilm*, son ejemplos adicionales de reguladores de la formación de *biofilms* en *P. aeruginosa* (90).

En *P. aeruginosa*, se han identificado cinco agrupaciones génicas relacionadas con la formación de esta matriz extracelular: los genes *alg* (PA3540-PA3551), los genes *psl* (PA2231-PA2245) y el operón *pel* (PA3058-PA3064) y otras dos agrupaciones (PA1381-PA1391 y PA3552-PA3558). Además los genes del operón *pel* son los únicos regulados por QS(299). El operón *pel* es el responsable de la producción de una matriz exopolisacárida rica en glucosa que forma parte de la estructura del *biofilm* (111). Este polisacárido es esencial para la adherencia del *biofilm* a

una superficie o para la formación de películas en medio líquido (111). Análisis de mutantes en el sistema Las de QS revelaron una significativa reducción de la formación de *biofilms* asociados a superficies y de la formación de películas en medio líquido (299). Por tanto, se estableció que tanto el sistema Las como el Rhl, éste en menor medida, están involucrados en la transcripción de los genes *pel*.

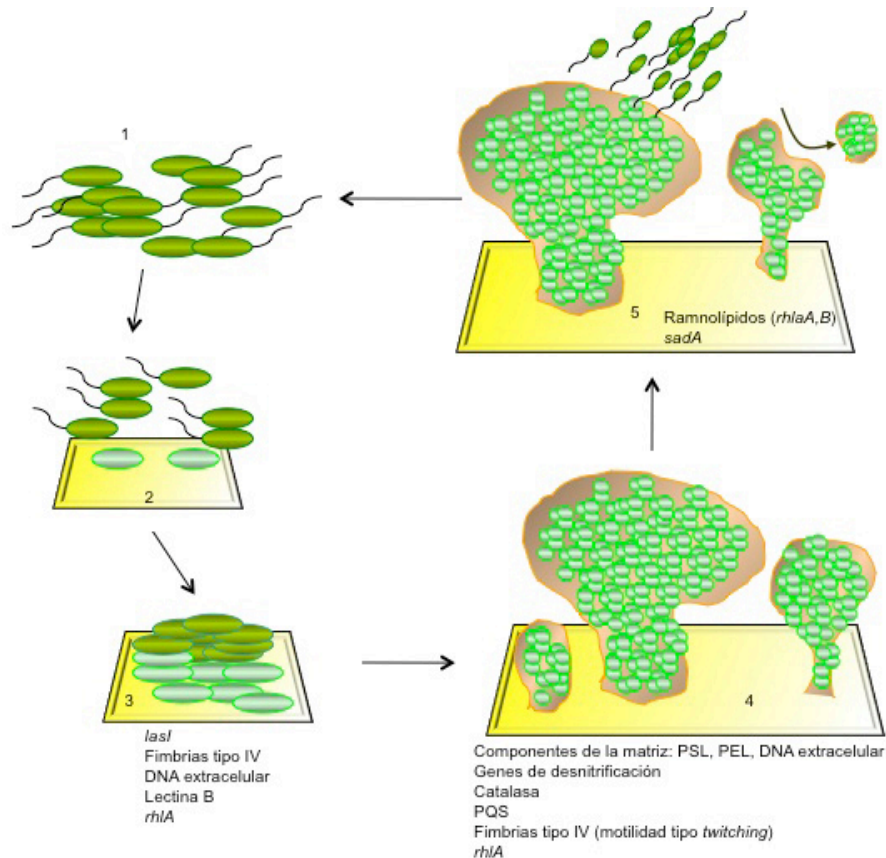


Figura 6: Formación del *biofilm* en *P. aeruginosa*. Las células creciendo de modo libre (1) se adhieren a una superficie sólida (2) y forman microcolonias (3). Bajo condiciones que estimulan la migración bacteriana (succinato, glutamato), las células se diseminan sobre el sustrato formando una masa plana y uniforme. Bajo condiciones que limitan el movimiento (glucosa) las microcolonias proliferan formando estructuras en forma de macrocolonias (4). Durante la maduración del *biofilm*, las células más expuestas en la superficie pueden desprenderse del biofilm y colonizar nuevas superficies (5). Al lado de cada paso se detallan los genes y factores implicados durante el desarrollo del *biofilm* que están regulados por QS. La producción de ramnolípidos controlada por QS es importante en la formación de las colonias (3), mantenimiento de los canales en el biofilm (4), formación de las macrocolonias (4) y dispersión desde el *biofilm* (5). Además la producción de polisacáridos controlados por el operón *pel* y la secreción de DNA, que son importantes para la formación de la matriz extracelular del *biofilm* (3,4), están también bajo el control de QS. La regulación por QS de la catalasa y la superóxido dismutasa es importante para la resistencia del *biofilm* a peróxido de hidrógeno (4). LecB está también involucrada en la biogénesis del pili y en el desarrollo del *biofilm* (4). PQS está ligado a la liberación de DNA durante la formación del *biofilm* (4). Finalmente es importante destacar la capacidad de *P. aeruginosa* de crecer de forma anaeróbica dentro del *biofilm*. Dentro del *biofilm* hay un gradiente de oxígeno, siendo la base y el centro de los *biofilms* anaeróbicos. *P. aeruginosa* puede usar aceptores de electrones alternativos al oxígeno, como nitrato o nitrito, mediante el proceso de desnitrificación, lo que le permite vivir bajo condiciones anaeróbicas. Los genes de desnitrificación están regulados por la vía *rhl* de QS (4). Adaptado de Kievit y cols., 2009 y Wagner y cols., 2008 (78, 364)

En la formación de los *biofilms* juega un papel muy importante la motilidad, ya que son los pili y los flagelos los principales responsables de la adhesión temprana de la bacteria a la superficie (259).

En ambientes líquidos, *P. aeruginosa* se mueve mediante un solo flagelo polar (motilidad tipo *swimming*) (59, 221, 342). En superficies sólidas, *P. aeruginosa* es capaz de tener dos tipos de movimientos asociados a superficie: *swarming* y *twitching*. Más recientemente se ha descrito que *P. aeruginosa* es capaz de llevar a cabo un movimiento tipo *sliding* en ausencia de flagelo y

pili tipo IV y bajo las mismas condiciones que promueven el movimiento tipo *swarming* (249). El movimiento de *twitching* está mediado por los pili tipo IV (70, 317, 365) mientras que el *swarming* bajo el control del sistema QS es dependiente de la presencia de un flagelo funcional, la producción de biosurfactantes y en algunos casos de los pili tipo IV (283). Se cree que el sistema QS ejerce su control en este tipo de motilidad mediante la producción de ramnolípidos, regulando los genes *rhlAB* (261). Se han presentado evidencias que apoyan el papel de la migración de la bacteria tanto en estados tempranos como tardíos del desarrollo del *biofilm*, y que depende de los pili, flagelos y ramnolípidos. La contribución de cada uno de ellos, es, sin embargo, fuertemente dependiente de las condiciones nutricionales. Una de las primeras investigaciones sobre genes que están involucrados en la iniciación de la formación del *biofilm* en *P. aeruginosa* reveló que el flagelo juega un papel importante en la adherencia de esta bacteria a superficies sólidas en medio mínimo con glucosa (259). Además, mutantes defectivos en pili tipo IV son capaces de adherirse, pero, sin embargo, son incapaces de formar las características microcolonias de los *biofilms* formados por las cepas silvestres (259). Posteriormente se demostró que el regulador global del metabolismo del carbono, Crc, regula la síntesis de los pili tipo IV, proporcionando una conexión entre el estado nutricional de la bacteria y el desarrollo del *biofilm* (258). La motilidad tipo *swarming* también está implicada en las fases tempranas del establecimiento del *biofilm* (324). Bajo condiciones que promueven este tipo de motilidad (succinato y glutamato) las células continúan moviéndose resultando en un *biofilm* plano y uniforme. Bajo condiciones limitantes para el *swarming* (glucosa), el *biofilm* se estructura en microcolonias (324).

1.4.6 Patogénesis de *P. aeruginosa* en las infecciones respiratorias

Como ya se ha mencionado con anterioridad, *P. aeruginosa* es el patógeno oportunista más relevante tanto en los procesos de infección pulmonar aguda en pacientes inmunocomprometidos o con ventilación mecánica como en infección pulmonar crónica en pacientes de FQ (61, 62).

El contacto entre la bacteria y la célula epitelial se produce mediante la adhesión de *P. aeruginosa* al glicolípido de la célula eucariota. Tanto los flagelos y los pili como el LPS ejercen un papel fundamental en la adhesión irreversible de la bacteria a las células epiteliales, lo que supone el paso inicial en la colonización del epitelio respiratorio (104, 133, 134, 223). Después del contacto, el T3SS se activa. Este sistema, como se ha mencionado en apartados anteriores, permite a la bacteria inyectar toxinas directamente en el citoplasma de la célula eucariota (157, 306). Las cuatro proteínas efectoras que se introducen a través de este sistema son: ExoY, ExoS, ExoT y ExoU, y todas participan, a distintos niveles, en la citotoxicidad de *P. aeruginosa* facilitando la diseminación de la bacteria (22, 109, 303, 390). Otros factores de virulencia secretados vía T2SS al espacio extracelular tales como elastasa (5, 16, 93), fosfatasa alcalina (322), exotoxina A (242) y fosfolipasa C (152, 176, 347) también participan en la invasión por destrucción del glicocálix protector del epitelio respiratorio. Todo esto va acompañado de una respuesta inflamatoria intensa en la que participan células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos), que activan los linfocitos iniciando la respuesta inmunológica. Una respuesta inmune exacerbada, típica en estos procesos patogénicos, contribuye al mantenimiento de la inflamación lo que conlleva a la destrucción del tejido respiratorio.

Durante la infección crónica una cepa ambiental de *P. aeruginosa* (que puede haber estado viviendo en suelo o agua) debe adaptarse a las nuevas condiciones del pulmón y vivir durante largo tiempo en el huésped. La esperanza de encontrar nuevos tratamientos reside en parte en comprender cómo la bacteria se adapta a las vías respiratorias y resiste las defensas del hospedador y a los antibióticos.

1.4.6.1 Adaptación de *P. aeruginosa* a la infección en pacientes de FQ

En las infecciones agudas predominan los fenómenos de invasión, diseminación y el daño generalizado de los tejidos por parte de *P. aeruginosa*. En cambio, en las infecciones crónicas *P. aeruginosa* experimenta una pérdida de la mayoría de sus factores inmunogénicos (pili, flagelos). Por otro lado, mediante la formación de los *biofilms*, *P. aeruginosa* se adhiere a la superficie del epitelio respiratorio y dificulta aún más su eliminación de los tejidos (Figura 7). Estos fenómenos están bajo el control de una gran variedad de sistemas de regulación que permiten a *P. aeruginosa* adaptarse al ambiente y a las defensas del hospedador. La selección de estas mutaciones adaptativas se cree que está favorecida por la alta prevalencia de cepas hipermutadoras en las infecciones crónicas, en contraste con lo que se observa en las infecciones agudas (216, 262). Las cepas hipermutadoras son aquellas que presentan una elevada frecuencia de mutación producida por mutaciones en genes implicados en los sistemas de reparación del ADN o en los sistemas que se encargan de evitar que se produzcan daños en el genoma (240). Este fenotipo hipermutador puede conferir una ventaja evolutiva durante la exposición de la bacteria a estos ambientes nuevos, cambiantes o de estrés, incrementando la tasa de mutaciones adaptativas (81, 127, 214, 341). Diferentes modelos experimentales han demostrado que en los fenotipos hipermutadores está incrementada la adaptación de la bacteria al sistema inmune del huésped (255) o a los tratamientos antibióticos (211).

Smith y cols., en 2006, secuenciaron el genoma de una cepa de *P. aeruginosa* en etapas tempranas de infección por FQ y el de la descendiente de esa cepa, todavía presente en los pulmones de los pacientes, 7,5 años después. Se encontraron 68 mutaciones en el aislado de etapas tardías. La mayoría de los cambios eran mutaciones de una base que producían un cambio o pérdida de la función de la proteína. La mayoría de las mutaciones que se producían eran no sinónimas lo que significa que la mayor parte de los cambios genéticos observados eran ventajosos para la vida dentro del hospedador (328). En este trabajo se observó que la selección favorecía la pérdida de función de algunos sistemas que le permiten a la bacteria invadir y dañar los tejidos del hospedador como el T3SS, la motilidad, la biosíntesis del antígeno O del LPS, la secreción de exotoxinas, proteasas y fenazinas (328). Estudios posteriores llevados a cabo sobre la colección de aislados clínicos de Smith y cols. (328) revelaron que la mayoría de las mutaciones adaptativas observadas en estos pacientes con FQ se producen en los aislados hipermutadores (235). En conjunto, estos resultados (328) están de acuerdo con otros trabajos previos. Hancock y cols., en 1983, llevaron a cabo un estudio con 26 aislados clínicos de pacientes con fibrosis quística, en los que observan defectos del LPS en comparación con la cepa de laboratorio de *P. aeruginosa* PAO1 (138). Luzar y cols., en 1985, observaron en pacientes de fibrosis quística que los aislados obtenidos de muestras de tracto respiratorio mostraban una pérdida de factores relacionados con la invasividad tales como la motilidad y la quimotaxis (208). Mahenthiralingham y cols., en 1994, observaron que un gran número de aislados clínicos de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes con infección crónica eran inmóviles y resistentes a la fagocitosis por macrófagos (212). Goodman y cols., en 2004, describen a RetS como un nuevo regulador global de numerosos factores de virulencia que dirige la respuesta de la bacteria expresando unos u otros genes dependiendo de las señales que ésta recibe del exterior (129). Lee y cols., en 2005, tomaron muestras a lo largo del transcurso de la infección crónica de ocho pacientes de FQ y analizaron los aislados clínicos de *P. aeruginosa* estudiando cambios fenotípicos y variaciones en la formación de *biofilms in vitro*. Las alteraciones fisiológicas estaban asociadas a la pérdida de motilidad y a una disminución de la producción de factores de virulencia (piocianina y proteasas) y a una reducción en la producción de señales de QS (algunos aislados eran incapaces de producir 3-O-C-AHL). Además los aislados eran heterógenos en la estructura del *biofilm* (194). Jain y cols., en 2004, estudiaron las propiedades del T3SS en aislados de tracto respiratorio de pacientes aquejados de FQ e infectados crónicamente. Observaron que la fracción

de aislados de *P. aeruginosa* de pacientes de FQ capaces de secretar proteínas del T3SS decrecía con la duración de la infección (159). Por otro lado, resultados de nuestro laboratorio (216) analizando muestras de pacientes aquejados de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) proporcionaban la primera evidencia de que *P. aeruginosa* causa infección crónica en pacientes de EPOC, con un patrón de infección y evolución parecido al que se observa en FQ. Se observó que los pacientes de EPOC están normalmente infectados con *P. aeruginosa* que evoluciona durante la infección crónica hacia un fenotipo de aumento de tasa de mutación y mayor resistencia a los antibióticos y una producción reducida de proteasas. Además, los aislados procedentes de pulmones infectados tendían a ser menos citotóxicos comparados con aislados procedentes de muestras sanguíneas.

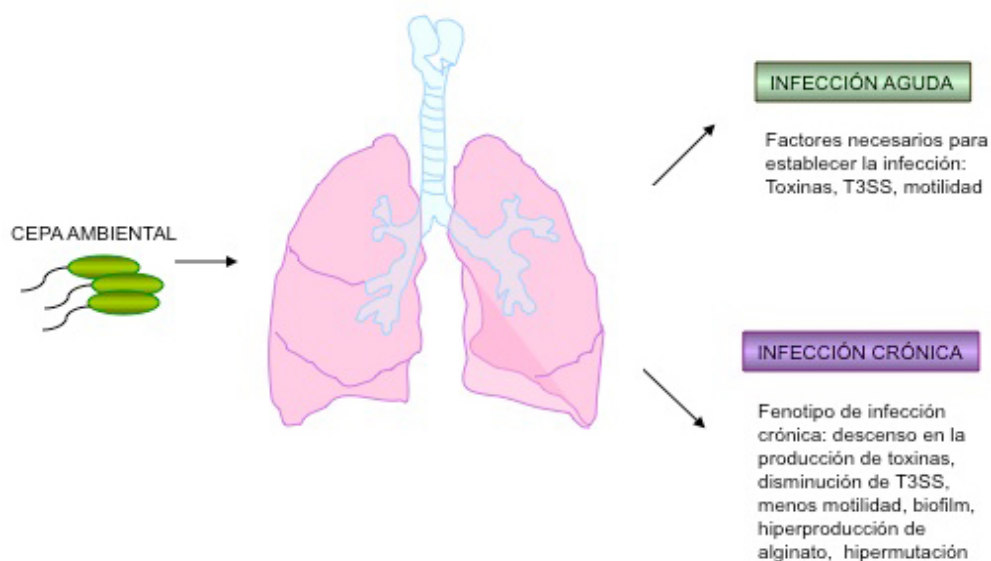


Figura 7: Adaptación de *P. aeruginosa* a la infección en pacientes de FQ: factores que se necesita para infección aguda e infección crónica. Adaptado de Nguyen y cols., 2006 (251).

Uno de los genes que está mutado frecuentemente en los aislados de *P. aeruginosa* procedentes de muestras de pacientes con infección crónica es el regulador de QS *lasR*. Se ha sugerido que los mutantes que tienen inactivados algunos reguladores centrales de este sistema como *LasR* o *Vfr*, tendrían una ventaja selectiva durante la infección crónica, ya que muchas de las funciones invasivas son eliminadas. Se ha sugerido que la pérdida de estas funciones permitiría a la bacteria evadir las defensas del hospedador porque muchos factores invasivos son a su vez ligados para el sistema inmune (Figura 7) (328).

A lo largo de la Introducción hemos podido ver que *P. aeruginosa* posee un gran número de determinantes cromosómicos que pueden contribuir, bien a su resistencia a los antibióticos, bien a su virulencia. El hecho de que estos determinantes se encuentren en gran parte o en todas las cepas de *P. aeruginosa* y no en islas de patogenicidad, indica que no son el resultado de la evolución reciente de este organismo, sino elementos antiguos y con un papel importante en la fisiología de esta bacteria. Podemos pensar entonces que la expresión y la actividad de estos elementos, pueden estar integradas en redes de regulación y redes metabólicas complejas. Es por tanto posible, que la resistencia y la virulencia de este patógeno oportunista tengan algún elemento en común. Para analizar esta posibilidad, en la presente Tesis Doctoral, nos hemos planteado los objetivos que se detallan en el siguiente apartado.

2 Objetivos

1. Determinar los elementos implicados en el fenotipo de resistencia intrínseca característico de *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Determinar los genes cuya inactivación puede incrementar la resistencia a los antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa*.
3. Analizar qué elementos entre los seleccionados en los Objetivos 1 y 2 juegan también un papel en la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* con el fin de definir las redes que interconectan la resistencia a los antibióticos y la virulencia de este patógeno oportunista.
4. Comenzar a analizar los mecanismos que median la interconexión entre resistencia y virulencia utilizando un número limitado de los mutantes seleccionados en el Objetivo 3.

3 Materiales y Métodos.

3.1 Material biológico, plásmidos y oligonucleótidos

El material biológico, los plásmidos y oligonucleótidos empleados en este trabajo se resumen en las siguientes tablas:

Tabla 1: Cepas bacterianas, líneas celulares y modelo animal utilizado en este trabajo

MATERIAL BIOLÓGICO	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA/ORIGEN
Cepas de <i>E. coli</i>		
CC118 λ pir	CC118 lisogenizada con el fago λ pir. Cepa huésped para el vector pKNG101 y sus derivados. $\Delta(ara-leu)$, $araD$, $\Delta lacX74$, $galE$, $phoA20$, $thi-1$, $rpsE$, $rpoB$, $argE$ (Am), $recA1$.	(80)
HB101	<i>supE44 hsdS20(r_Bm_B) recA13 ara14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 syl-5 mtl-1</i> .	(301)
TG1	Cepa huésped para transformaciones. <i>supE44 hsdΔ5 thi Δ (lac-proAB) F'[traD36_proAB⁺ lacI^q lacZAM15]</i>	(301)
XL1-Blue	Cepa huésped para transformaciones. <i>SupE hsdR lac' F' proAB⁺ lacI^q lacZAM15</i> .	(301)
DH5 α	Cepa huésped para transformaciones. <i>supE44 $\Delta lacU169$ (ϕ80 lacZAM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> .	(301)
BL21(DE3)pLysS	Cepa para sobreexpresión desde el promotor de T7 en el plásmido pET28a(+). <i>hsdS gal (λclts857 ind1 S am7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)</i>	(301)
One Shot OmniMAX™ 2 T1 Phage-Resistance Cells	Hospedador para manipulaciones de DNA (vector pMMBHE y sus derivados) y transformaciones en ensayos de complementación	Invitrogen
One Shot TOP 10' Competent Cells	Hospedador para manipulaciones de DNA (vector pCR2.1 y sus derivados) y transformaciones en ensayos de delección	Invitrogen
MI1443	Cepa $\Delta frdABCD \Delta ampC recA$ Sm ^r	(53)
AF26	Cepa silvestre MI1443 que contiene el plásmido pUCP24	Este trabajo
AF27	Cepa silvestre MI1443 que contiene el plásmido pAFL019	Este trabajo
AF28	Cepa BL21(DE3)pLysS que contiene el plásmido pET28a(+)	Este trabajo
AF29	Cepa BL21(DE3)pLysS que contiene el plásmido pAFL002	Este trabajo
Cepas de <i>P. aeruginosa</i>		Este trabajo
59.20	Cepa silvestre de la genoteca creada por la inserción del transposón mini TnphoA3	(77)

AF01	Cepa silvestre 59.20 que contiene el plásmido pMMB67-HE	Este trabajo
AF02	Cepa silvestre 59.20 que contiene el plásmido pAFL009	Este trabajo
AF03	Cepa silvestre 59.20 que contiene el plásmido pAFL010	Este trabajo
AF04	Mutante obtenido a partir de la cepa 59.20 por inserción del transposón mini TnphoA3 en el gen <i>PA4112</i>	Este trabajo
AF05	Mutante AF04 que contiene el plásmido pMMB67-HE	Este trabajo
AF06	Mutante AF04 que contiene el plásmido pAFL009	Este trabajo
AF07	Mutante obtenido a partir de la cepa 59.20 por inserción del transposón mini TnphoA3 en el gen <i>PA5542</i>	Este trabajo
AF08	Mutante AF07 que contiene el plásmido pMMB67-HE	Este trabajo
AF09	Mutante AF07 que contiene el plásmido pAFL010	Este trabajo
TB	Cepa silvestre de la genoteca creada por la inserción del transposón mini Tn5	(374)
AF10	Cepa silvestre TB que contiene el plásmido pMMB67-HE	Este trabajo
AF11	Cepa silvestre TB que contiene el plásmido pAFL007	Este trabajo
AF12	Cepa silvestre que contiene el plásmido pAFL008	Este trabajo
AF13	Mutante obtenido a partir de la cepa TB por inserción del transposón mini Tn5 en el gen <i>PA2527</i>	Este trabajo
AF14	Mutante AF13 que contiene el plásmido pMMB67-HE	Este trabajo
AF15	Mutante AF13 que contiene el plásmido pAFL007	Este trabajo
AF16	Mutante obtenido a partir de la cepa TB por inserción del transposón mini Tn5 en el gen <i>PA3704</i>	Este trabajo
AF17	Mutante AF16 que contiene el plásmido pMMB67-HE	Este trabajo
AF18	Mutante AF16 que contiene el plásmido pAFL008	Este trabajo
PAO1	Cepa silvestre de origen clínico conservada en Marsella	IBSM-CNRS (Marsella)
AF19	Mutante obtenido por la delección del gen <i>PA2527</i> en la estirpe silvestre de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Este trabajo
AF20	Mutante obtenido por la delección del gen <i>PA4112</i> en la estirpe silvestre de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Este trabajo
AF21	Mutante obtenido por la delección del gen <i>PA3704</i> en la estirpe silvestre de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Este trabajo
PA14	Cepa silvestre de origen clínico conservada en Marsella	IBSM-CNRS (Marsella)
AF22	Mutante obtenido por la delección del gen <i>PA5542</i> en la estirpe silvestre de <i>P. aeruginosa</i> PA14	Este trabajo
AF23	Mutante obtenido por la delección del gen <i>PA3704</i> en la estirpe silvestre de <i>P. aeruginosa</i> PA14	Este trabajo

AF24	Cepa silvestre 59.20 que contiene el plásmido pUCP24	Este trabajo
AF25	Cepa silvestre 59.20 que contiene el plásmido pAFL019	Este trabajo
Líneas celulares eucariotas		
J774	Línea celular de macrófagos de ratón	(65)
Modelos animales		
Ratón (C57BL/6J)	Hembras de ratones de 20-25 Gramos	Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona

Tabla 2: Construcciones empleadas en este trabajo

PLÁSMIDOS	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA/ORIGEN
pGemT-Easy	Amp ^R , Vector comercial para clonar productos de PCR	Promega
pAFL001	Plásmido derivado de pGemT-Easy que lleva el gen <i>PA5542</i> de la cepa de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Este trabajo
pET28a(+)	Kan ^R , promotor de T7, vector de expresión	Novagen
pNMM1	Plásmido derivado de pET28a(+) que lleva el gen <i>PA5542</i> de la cepa de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Este trabajo
pDONR201	Kan ^R , Cm ^R . <i>ori</i> pUC. <i>Gateway entry vector</i> para recombinación.	Invitrogen
pAFL003	Plásmido derivado de pDONR201 que lleva el gen <i>PA2527</i> de la cepa de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	(185)
pAFL004	Plásmido derivado de pDONR201 que lleva el gen <i>PA3704</i> de la cepa de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	(185)
pAFL005	Plásmido derivado de pDONR201 que lleva el gen <i>PA4112</i> de la cepa de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	(185)
pAFL006	Plásmido derivado de pDONR201 que lleva el gen <i>PA5542</i> de la cepa de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	(185)
pMMB67-HE	pMMB66HE Δ[polylinker M13mp8], Ω[polylinker M13mp8]	(114)
pAFL007	Plásmido derivado de pMMB67-HE que lleva el gen <i>PA2527</i> de la cepa de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Este trabajo
pAFL008	Plásmido derivado de pMMB67-HE que lleva el gen <i>PA3704</i> de la cepa de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Este trabajo
pAFL009	Plásmido derivado de pMMB67-HE que lleva el gen <i>PA4112</i> de la cepa de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Este trabajo
pAFL010	Plásmido derivado de pMMB67-HE que lleva el gen <i>PA5542</i> de la cepa de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Este trabajo
pCR2.1	Amp ^r . Promotor de T7. Vector comercial para clonar productos de PCR	Invitrogen
pAFL011	Plásmido derivado de pCR2.1 que lleva el gen	Este trabajo

	PA2527 de la cepa de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	
pAFL012	Plásmido derivado de pCR2.1 que lleva el gen PA3704 de la cepa de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Este trabajo
pAFL013	Plásmido derivado de pCR2.1 que lleva el gen PA4112 de la cepa de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Este trabajo
pAFL014	Plásmido derivado de pCR2.1 que lleva el gen PA5542 de la cepa de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Este trabajo
pKNG101	Sm ^R <i>oriR6K6 sacAB RK2-mob⁺</i> . Plásmido suicida para mutagénesis por intercambio alélico	(169)
pAFL015	Plásmido derivado de pKMG101 que lleva el gen PA2527 de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Este trabajo
pAFL016	Plásmido derivado de pKMG101 que lleva el gen PA3704 de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Este trabajo
pAFL017	Plásmido derivado de pKMG101 que lleva el gen PA4112 de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Este trabajo
pAFL018	Plásmido derivado de pKMG101 que lleva el gen PA5542 de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Este trabajo
pRK2013	Km ^R <i>oriV ColE1 RK2-mob⁺ RK 2-tra⁺</i> . Plásmido auxiliar en conjugaciones tripartitas.	(106)
pUCP24	Sustitución de un fragmento Scal-StuI de 1352-bp en el plásmido pUCP18 con el fragmento de extremos romos de 832pb que codifica para Gm ^R procedente del vector pUCGM.	(367)
pAFL019	Plásmido derivado de pUCP24 que lleva el gen PA5542 de la cepa de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	Este trabajo

Tabla 3: Oligonucleótidos usados en este trabajo

OLIGONUCLEÓTIDOS	SECUENCIA	DESCRIPCIÓN/FUNCIÓN
Gm1	TGGACCAGTTGCGTGAGCGCAT	PCR inversa. Secuenciar mutantes de inserción de genoteca mini phoA3 (77)
PhoA5	GCGGCAGTCTGATCACCCGTTA	PCR inversa. Secuenciar mutantes de inserción de genoteca mini phoA3 (77)
Gm2	TGTCAACTGGGTTTCGTGCCTTC	PCR interna. Secuenciar mutantes de inserción de genoteca mini phoA3 (77)
PhoA4	GCACCGCCGGGTGCAGTAATTA	PCR interna. Secuenciar mutantes de inserción de genoteca mini phoA3 (77)
Tn5d	CGAACCGAACAGGCTTATGTC	PCR inversa (Este trabajo). Secuenciar mutantes de inserción de genoteca miniTn5
Tn5c	TGCTGGCCTTTTGCTCACAT	PCR inversa (Este trabajo). Secuenciar mutantes de inserción de genoteca miniTn5
UPS-5542	CATAAGGACCATGGCCATGCGTAG	Amplificación del gen PA5542 para

		clonarlo en el vector pET28a(+)
DOWN-5542	ATCCGTTTCGCGCGGCCGCCTAGCG	Amplificación del gen <i>PA5542</i> para clonarlo en el vector pET28a(+)
Bam-5542	AAGGAAAGGATCCATGCGTA	Amplificación del gen <i>PA5542</i> para clonarlo en el vector pUCP24
Hind-5542	TATCCGTAAGCTTACGGCCC	Amplificación del gen <i>PA5542</i> para clonarlo en el vector pUCP24
OAA1	GATCTTCGGTTCGATCCTCTTC	Construcción mutante de delección en el gen <i>PA4112</i>
OAA2a	GCCGGGGTTACACCCGATATTC	Construcción mutante de delección en el gen <i>PA4112</i>
OAA3	ATATCGGGTGTGAACCCCGGC	Construcción mutante de delección en el gen <i>PA4112</i>
OAA4	AAGACCTGGAACACCTGCTG	Construcción mutante de delección en el gen <i>PA4112</i>
OAA5	GCCTCAACCTGACCTTCACC	Construcción mutante de delección en el gen <i>PA2527</i>
OAA6	GACAGACTCATCGGTTCATTGAG	Construcción mutante de delección en el gen <i>PA2527</i>
OAA7	CTGAATGAACCGATGAGTCTGTC	Construcción mutante de delección en el gen <i>PA2527</i>
OAA8	CCAGTGCTTGTCGTCCTTCT	Construcción mutante de delección en el gen <i>PA2527</i>
OAA9	GAGAAGGTGCTCTGGGAAGA	Construcción mutante de delección en el gen <i>PA5542</i>
OAA10	ACGGCCCTAACAGCTACGCAT	Construcción mutante de delección en el gen <i>PA5542</i>
OAA11	CGTAGCTGTTAGGGCCGTGGG	Construcción mutante de delección en el gen <i>PA5542</i>
OAA12	GAAGCAGCAGGCTTATCCAC	Construcción mutante de delección en el gen <i>PA5542</i>
OAA21	GCCGAAACGATGGACAGC	Construcción mutante de delección en el gen <i>PA3704</i>
OAA22	ATCCTCAACCGGTCATGCCAG	Construcción mutante de delección en el gen <i>PA3704</i>
OAA23	TGGCATGACCGGTTGAGGATCG	Construcción mutante de delección en el gen <i>PA3704</i>
OAA24	CACTGCGGCATTGAAACTG	Construcción mutante de delección en el gen <i>PA3704</i>
Univ -20	GTAAAACGACGGCCAGT	Comprobar el inserto en el vector pCR2.1
Rev -21	AAACAGCTATGACCATG	Comprobar el inserto en el vector pCR2.1
RpKN	CATATCACAACTGCGTGGA	Comprobar la desaparición del gen del cromosoma en los mutantes de delección

FpKN	AAGACTCTAGACCTAGGCCT	Comprobar la desaparición del gen del cromosoma en los mutantes de delección
L1R1	CAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	Comprobar inserto en el vector pMMB67-HE de los mutantes complementados
L2R2	ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	Comprobar inserto en el vector pMMB67-HE de los mutantes complementados

3.2 Medios, soluciones y condiciones de cultivo

3.2.1 Condiciones de crecimiento para la bacteria

Las bacterias se crecieron rutinariamente en medio rico Luria-Bertani (LB) a 37°C y en agitación (301). Los medios específicos para los distintos ensayos funcionales se describen a continuación.

Para los ensayos de sensibilidad a los antibióticos se utilizó medio agar Müller-Hinton (MH), al que se añadieron los diferentes antibióticos a las concentraciones requeridas (15).

Para seleccionar mutantes de delección y complementación en cepas de *P. aeruginosa* se utilizó medio PIA (*Pseudomonas* Isolation Agar. Fluka) al que se añadían los antibióticos a las concentraciones requeridas.

Para la inducción del T3SS, al medio LB se añadió EGTA 5mM y MgCl₂ 20mM (205).

Para el análisis de la producción de piocianina las bacterias se crecieron en medio AAC (15).

Para los ensayos de motilidad se usaron los siguientes medios (283): para los experimentos de *swimming* (10g/l de triptona difco, 5g/l de NaCl con 0,3% (wt/vol) agar Gibco/BRL); *swarming* (8g/l de Nutrient Broth, 5g/l de glucosa y 0,5% Difco agar) y *twitching* (LB, Agar difco 1%).

3.2.2 Condiciones de crecimiento para células eucariotas

Los macrófagos de ratón se incubaron en estufas a 37°C, 5% CO₂ en medio base DMEM al que se añadía 1% de antimicótico, 1% de penicilina-estreptomicina, 10% de Suero Fetal Bovino inactivado por calor (GIBCO).

3.3 Técnicas de DNA

3.3.1 Técnicas generales

Para electroforesis en gel de agarosa se siguieron protocolos ya establecidos (301).

Para la extracción de DNA genómico se utilizó el protocolo descrito en el sistema comercial *Genome DNA Kit* (Q-BIOgene).

La extracción de DNA plasmídico se realizó mediante el sistema comercial de purificación *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN). Para la purificación de fragmentos de DNA se utilizaron: *QIAquick PCR Purification Kit* y *QIAquick Nucleotide Removal Kit* (QIAGEN) ó *DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare).

Las digestiones y ligaciones se realizaron en las condiciones y con los tampones indicados para cada caso por la casa comercial correspondiente; salvo para los experimentos de amplificación de DNA genómico por PCR inversa, que se detallan a continuación.

3.3.2 Amplificación de DNA

Se utilizaron dos enzimas diferentes:

PCR Master Mix (Promega) en las condiciones recomendadas por el fabricante con los siguientes ciclos: 5 minutos a 94°C y posteriormente 30 ciclos de: 30 segundos a 50-65°C (en función de la temperatura de fusión de los oligonucleótidos), 30 segundos a 94°C y 1-3 minutos a 72°C (en función de la longitud del fragmento que se desee amplificar), más una extensión adicional de 7 minutos a 72°C. Se utilizó en los protocolos rutinarios de PCR.

Expand Long Template PCR System (Roche): se utilizó para determinar la posición de los transposones en el genoma de *P. aeruginosa* mediante PCR inversa. Para obtener el DNA molde para la PCR inversa se digirió 1µg de DNA en 100 µl de reacción utilizando PstI (Biolabs) y se recircularizaron los fragmentos de restricción (100ng de los fragmentos de restricción en 200 µl de reacción) con T4DNA Ligasa (Biolabs). El DNA ligado se precipitó y todo el DNA se utilizó como molde para la reacción de PCR inversa (301). Los ciclos empleados fueron: 2 minutos a 94°C y posteriormente 30 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C y 7 minutos a 68°C, más una extensión adicional de 10 minutos a 68°C. Los amplicones se secuenciaron en los Servicios de Secuenciación del CNB y de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid.

3.4 Manipulaciones genéticas

3.4.1 Técnicas generales

Para transformar *E.coli* se siguió el protocolo de CaCl₂ ya establecido (301).

Para la preparación de las células electrocompetentes se siguieron dos protocolos establecidos (301). A) Electrocompetentes con sacarosa: de un cultivo O/N (16-20h) crecido en medio LB a 37°C, se centrifugaron 6ml a temperatura ambiente durante 2 minutos a 16000g. A continuación, las células se resuspendieron en 4ml de sacarosa 300mM a temperatura ambiente. Esta operación se repitió dos veces. Finalmente, las células se resuspendieron en 100µl de sacarosa 300mM, que contenían aproximadamente 10⁹-10¹⁰ células viables. B) Electrocompetentes con agua destilada estéril: se inocularon 10 ml de medio LB con la cepa correspondiente y se crecieron 16-20 horas a 37°C. Se diluyeron a A₆₀₀ 0,025 en medio LB precalentado, y se incubaron con agitación fuerte a 37°C hasta A₆₀₀ 0,5. El cultivo se enfrió en hielo durante 30 minutos. Las células se centrifugaron a 4000 g, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en la mitad de volumen de agua destilada estéril a 4°C. Después de repetir este paso dos veces, disminuyendo el volumen a la mitad en cada centrifugación se resuspendieron las células en 1/20 del volumen inicial en glicerol 10% v/v estéril a 4°C. Se volvió a centrifugar y finalmente las células se resuspendieron en glicerol 10% v/v estéril a 4°C hasta una concentración final de 2x10¹¹ cel/ml y en alícuotas de 100 µl y se mantuvieron a -80°C hasta electroporar.

La movilización de plásmidos a *P. aeruginosa* se efectuó por conjugación tripartita (80) utilizando la cepa *E. coli* HB101 (pRK2013) como colaborador en la movilización.

3.4.2 Construcción de estirpes mutantes de delección

Para construir mutantes de delección se utilizó el vector suicida pKNG101 (169). Se amplificaron mediante PCR los dos fragmentos de aproximadamente 500pb que flanquean en el

cromosoma bacteriano al gen de interés (fragmentos “A” y “B”). Se clonó en pKNG101 el fragmento de aproximadamente 1Kb (fragmento “AB”) resultante de la amplificación conjunta de los dos fragmentos. El gen fue eliminado del cromosoma de *P. aeruginosa* mediante recombinación homóloga en dos pasos. Primero, *E. coli* CC118 λ pir (pKNG101+AB) se conjugó con las cepas correspondientes de *P. aeruginosa*. Esto condujo a la integración del plásmido en el cromosoma, por un evento simple de recombinación homóloga. Los transconjugantes, seleccionados con estreptomicina, eran sensibles a sacarosa debido a la síntesis de compuestos tóxicos por el producto del gen *sacB* presente en el vector. Para el segundo paso, se reestrió una colonia aislada en una placa de LB agar que contenía 6% de sacarosa y se incubó a temperatura ambiente durante 48-72 horas. Esto permitió la selección de un segundo evento de recombinación en el que el gen de interés era eliminado de forma estable del cromosoma de *P. aeruginosa*.

3.4.3 Construcción de cepas para ensayos de complementación

Para ello se utilizó una colección completa de genes de *P. aeruginosa* PAO1 clonados en *Gateway entry vector pDONR* (185). Los genes fueron subclonados mediante *Gateway Technology* de Invitrogen: se mezcló el clon que contiene el vector pDONR201 más el gen de interés *in vitro* con el vector de expresión adecuado, previamente linearizado (en nuestro caso se usó el vector pMMB67HE-42, linearizado con NotI, que añade 6 histidinas en el extremo N-terminal de la proteína). A esta mezcla se añadió una clonasa (*Gateway LR Clonase*, Invitrogen). Por recombinación específica de sitio, entre los sitios *att* de los dos vectores, se generó un clon de expresión que contenía el gen de interés recombinado en el vector pMMB67HE-42. A continuación, se introdujo en células Omnimax por transformación. Se comprobaron los clones positivos mediante tres procedimientos: 1º) analizando su perfil de resistencia a los antibióticos (resistentes a ampicilina y sensibles a kanamicina y cloramfenicol), 2º) con las enzimas de restricción correspondientes se comprobó el tamaño de inserto, y 3º) finalmente, se estudió la expresión de la proteína en *E. coli* por *Western Blot*. Por último, las construcciones positivas fueron introducidas en la cepa correspondiente de *P. aeruginosa* por conjugación tripartita o por electroporación. Los mutantes se seleccionaron en medio PIA al que se añadió carbenicilina 350 μ g/ml.

Los análisis por *Western blot* se realizaron según protocolos descritos (301). Las proteínas de los extractos totales separadas en geles SDS-PAGE se transfirieron a una membrana Immobilon-P (Millipore, USA) con un aparato de transferencia semi-seca Bio-Rad, siguiendo las indicaciones del fabricante. Como control de transferencia las membranas se tiñeron con una solución de Rojo Ponceau al 0.1% en ácido acético al 1%. Una vez lavadas se bloquearon 12-16 horas en una solución al 2% de leche descremada en polvo en tampón de incubación (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 80). La incubación con los anticuerpos primarios y secundarios se efectuó según se describe en Sambrook y cols., 2001 (301).

3.5 Técnicas de proteínas

3.5.1 Técnicas generales

La preparación de muestras de extractos totales de proteínas a partir de cultivos y la separación electroforética de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (PAGE-SDS) se realizó siguiendo protocolos previamente descrito (301). La concentración de proteínas en los extractos totales se determinó utilizando el reactivo BCA (Pierce) según las instrucciones del fabricante.

Los análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF) fueron realizados por el Servicio de Proteómica del CNB (321). Las bandas de interés se extrajeron del gel, se trataron con tripsina

y los péptidos que se generaron se analizaron por MALDI-TOF para determinar el espectro de masas de cada péptido. Los espectros de masas de cada banda se compararon con una digestión virtual de cada proteína codificada por *P. aeruginosa* PAO-1 (www.pseudomonas.com), detectando que proteína representa cada banda en nuestro gel.

3.5.2 Análisis de las proteínas del Sistema de Secreción Tipo III

La T3S se indujo tal y como se describe en protocolos ya establecidos (205). Se crecieron las distintas cepas de *P. aeruginosa* en medio líquido LB durante 16 horas a 37°C con agitación. Los cultivos se diluyeron hasta A₆₀₀ 0,1 en medio LB que contenía 5 mM EGTA y 20 mM MgCl₂ (condiciones de inducción). Se crecieron estos cultivos durante 4 horas. A continuación, se centrifugaron los cultivos durante 10 minutos a 7000 r.p.m. y 4°C. Posteriormente, se tomaron 40 µl de los sobrenadantes de cada cultivo y se analizaron mediante SDS-PAGE. Las proteínas secretadas, entre las que se encuentran las proteínas del T3SS, se visualizaron por tinción con plata usando *Silver Staining Kit PlusOne* (Amersham Biosciences).

3.6 Técnicas para determinar el fenotipo de los mutantes

3.6.1 Determinación de la sensibilidad a los antibióticos de los mutantes.

Los mutantes se crecieron O/N en cultivo estático en placas de 96 pocillos en LB líquido. Con un replicador los mutantes se diluyeron y se crecieron de 16 a 20 horas a 37°C en placas MH-agar con antibiótico (imipenem, ciprofloxacina, tetraciclina, polimixina B, amicacina y ceftazidima) a distintas concentraciones: concentración mínima inhibitoria (CMI) de la estirpe silvestre, y concentraciones superiores e inferiores.

3.6.2 Ensayos de identificación de actividad β -lactamasa

3.6.2.1 Clonaje del gen PA5542 de *P. aeruginosa* en *E. coli*

Se amplificó el gen PA5542 del genoma de la estirpe silvestre 59.20. Para la reacción de PCR se utilizó la polimerasa *Expand Long Template* (Roche) y se utilizó el siguiente programa de amplificación: 2 minutos a 94°, 25 ciclos de 10 segundos a 94°, 30 segundos a 57°, 2 minutos a 68° y 3 minutos de elongación final a 68°. El fragmento de DNA obtenido se clonó en el vector pET28a (+) (Novagen), o en el vector pUCP24 (367) y el producto de ligación se transformó en la cepa DH5 α o XL1-Blue de *E. coli* respectivamente. La obtención de colonias transformadas con el vector recombinante se comprobó por PCR de colonia y mediante restricción, recuperándose el inserto como fragmento NcoI-NotI o EcoRI-BamHI. El inserto se secuenció para comprobar que no portaba ninguna mutación.

3.6.2.2 Expresión del gen clonado

Para la expresión del gen PA5542 se utilizaron las cepas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS y la cepa MI1443 que no porta la β -lactamasa cromosómica; y la cepa silvestre 59.20 de *P. aeruginosa*. Se transformaron bacterias tanto con el plásmido recombinante como con el vector que no contenía el inserto, como control negativo para los ensayos de funcionalidad.

3.6.2.3 Determinación de las CMIs a distintos β -lactámicos

Se plaqueó la cepa BL21(DE3)pLysS transformada con el vector recombinante en placas de agar MH en condiciones de inducción (concentración final IPTG 1mM) y en presencia de concentraciones crecientes de distintos antibióticos β -lactámicos. Como control negativo se realizó el mismo ensayo con la cepa transformada con el vector sin inserto, a fin de comparar las CMIs obtenidas en ambos casos.

Se sembró la cepa MI1443 transformada con el vector recombinante en placas de agar MH en condiciones de inducción. Se efectuaron los ensayos de E-test según condiciones del fabricante (AB Biodisk) con tiras de imipenem, meropenem y aztreonam

3.6.2.4 *Análisis cuantitativo de la actividad β -lactamasa utilizando la cefalosporina cromogénica nitrocefina como sustrato.*

Se centrifugaron 40ml de un cultivo O/N inducido de cada estirpe y el sedimento celular se resuspendió en 1ml de tampón fosfato 0.1M pH 7. Los extractos fueron sonicados y a continuación las células se sedimentaron por centrifugación. Tras determinarse la concentración proteica de la fracción soluble (*BCA Protein Assay Kit*, Pierce), ésta se incubó con una solución de nitrocefina preparada según instrucciones del fabricante (Oxoid). Se midió el aumento de absorbancia de la mezcla de reacción a 486nm durante 35 minutos, tomando medidas cada minuto. Como control se utilizó el extracto de células transformadas con el vector sin inserto.

3.6.2.5 *Análisis cuantitativo de la actividad imipenemasa*

Los extractos celulares obtenidos como se describen en el Apartado 3.6.2.4 se incubaron con una solución de imipenem diluida a 300 μ M en tampón fosfato 0.1M pH 7. Se mezclaron 200 μ l del extracto, 200 μ l de la solución de imipenem y 600 μ l de tampón. La actividad imipenemasa se determinó a 297nm durante 1h a 37°C tomando puntos cada cinco minutos. Como control se utilizó el extracto de células transformadas con el plásmido sin inserto.

3.6.3 Ensayo de infección en células eucariotas

Para este ensayo se usó la línea celular de macrófagos de ratón J774 (65). La línea celular se creció en medio DMEM suplementado tal y como se indica en el Apartado 3.2.2. Los macrófagos se sembraron en placas p96 (NUNC) hasta que alcanzaron confluencia. En el día del ensayo, las células se lavaron tres veces con PBS y se infectaron con cultivos O/N de las cepas de *P. aeruginosa* que se iban a analizar diluidas en medio DMEM sin suero ni antibiótico. Se infectaron 8 pocillos por cada cepa en los distintos ensayos. Después de 3 horas de infección, la citotoxicidad se evaluó cuantificando la presencia de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo (*Citotoxicity Detection Kit*, Roche). Los valores se calcularon en porcentajes. El 100% de citotoxicidad se determinó lisando las células con Tritón X-100 al 2% (vol/vol). El nivel basal de citotoxicidad (0%) se determinó incubando las células con medio DMEM sin bacterias.

3.6.4 Análisis de piocianina

Los mutantes se incubaron a 37°C en agitación durante 40 horas en medio líquido AAC (15). Posteriormente, se centrifugaron los cultivos a 7000 r.p.m., 10 minutos, 2 veces. Se recogieron los sobrenadantes y se midió la densidad óptica de las muestras a 690 nm (58).

3.6.5 Análisis de pioverdina

Los mutantes se incubaron a 37°C en agitación O/N en medio líquido LB. A continuación se centrifugó el sobrenadante de los cultivos a 7000 r.p.m., 10 minutos, 2 veces; y se midió la fluorescencia de los mismos: la longitud de onda de excitación de la pioverdina es de 400nm y emite fluorescencia a una longitud de onda de 460nm.

3.6.6 Formación de *biofilms*

Se añadieron 100 μ l/pocillo de una dilución 1/100 de cultivos O/N de los mutantes en las placas p96 (Falcon 3911microtest III). Se cultivaron O/N las placas sin agitación a 37°C. A

continuación, se tiñeron con 25 µl/pocillo de cristal violeta al 0,1% en etanol, y se lavó con agua el exceso de colorante. Finalmente, los *biofilms* se despegaron de la placa con una solución de Tritón X-100 al 0,25% en etanol y se midió la absorbancia a 570nm (260).

3.6.7 Ensayo de proteasas

Caseinasa: (24) se incubaron 100 microlitros de sobrenadante de cultivo celular con 100µl de azocaseína (5mg/ml) en 100mM Tris (pH 8) durante 1 hora a 37°C. La reacción se paró con 400µl de ácido tricloroacético al 10% y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Después, se centrifugó 10 minutos a 13000 r.p.m., y el ácido tricloroacético del sobrenadante se neutralizó con 700 microlitros de NaOH 525mM. Finalmente, se midió la densidad óptica del sobrenadante a 442nm.

Elastasa: (297) para medir la elastasa, 100µl de sobrenadante de cultivo O/N se mezclaron con 1ml de suspensión Rojo Congo a 10mg/ml en 0,1M Tris-HCl pH 7,4 y se incubaron a 37°C durante 6 horas en agitación. A continuación, se centrifugaron las muestras 10 minutos a 4000 r.p.m. y se midió la densidad óptica de los sobrenadantes a 495nm.

3.6.8 Análisis estadístico de los datos

Los resultados se expresaron como la relación de cada mutante con respecto a su cepa silvestre (\log_2 [mutante/silvestre]) agrupadas utilizando el proGrama informático: <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>.

3.6.9 Ensayos de motilidad

Según el tipo de motilidad que se midiera se procedió de diferente modo (283):

Swimming: con una palillo se picó una colonia de una placa crecida en LB agar a 37°C durante 24 horas, y se incubó la placa de *swimming* O/N a 30°C.

Swarming: las placas con el medio específico de *swarming* se dejaron secar O/N a temperatura ambiente. Al día siguiente se tomó una muestra del mutante crecido en la placa de *swimming* y se incubó a 30°C O/N.

Twitching: de una placa crecida en LB agar a 37°C O/N se tomó una colonia y la placa de *twitching* se dejó incubando durante dos días a 37°C. Al cabo de 48h se retiró el medio de la placa se incubó con una solución de cristal violeta al 0,1% en etanol durante 1 minuto. Posteriormente, se lavó la placa y se observó el halo de movimiento de la bacteria.

3.7 Técnicas de infección *in vivo*

3.7.1 Preparación del inóculo para la infección pulmonar en ratón

El protocolo de preparación del inóculo fue diferente para infección aguda o crónica:

3.7.1.1 Preparación de inóculo para infección aguda

Una dilución 1/50 de un cultivo O/N se creció en agitación a 37°C hasta A_{600} 0,5. A continuación, se centrifugó 1ml de cultivo a 3000 r.p.m., 15 minutos a 4°C y se resuspendió en 2 ml de suero salino. Finalmente, los ratones fueron inoculados con $2 \cdot 10^5$ en 20 µl de inóculo.

3.7.1.2 Preparación del inóculo para infección crónica

Para la preparación de este inóculo se siguió el procedimiento descrito anteriormente (357).

Una dilución 1/50 de un cultivo O/N se creció en agitación a 37°C hasta A_{600} 1. Las células fueron posteriormente centrifugadas (10ml de cultivo a 3000 r.p.m., 15 minutos a 4°C). A continuación, el sedimento se resuspendió en el mismo volumen de suero salino, y se añadieron 2 ml de la suspensión a 18 ml de agarosa de bajo punto de fusión al 2%. De la mezcla anterior, se añadieron entre 10 ml y 30 ml de aceite mineral atemperado a 50-55°C. Dicha mezcla se mantuvo en agitación fuerte a temperatura ambiente durante 6 min. Seguidamente, se enfrió poco a poco manteniendo la agitación durante 10 minutos más. A continuación, la mezcla se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó dos veces con desoxicolato sódico y tres con PBS. Tras el último lavado de PBS se añadieron 4 ml de PBS y se mezcló por inversión. Al final se obtuvo una cuantificación de bacterias de 1.10^4 en 20 μ l de inóculo.

3.7.2 Protocolo de infección pulmonar con *P. aeruginosa* en el modelo ratón

En cada experimento de infección se usaron 10 ratones por cepa, con un seguimiento de la evolución de la infección de siete días. Además se incluyeron, como controles de la infección 4 ratones por cepa en cada experimento. Los ratones control fueron sacrificados a las 24 horas y sus pulmones se examinaron para confirmar la colonización de dicho órgano.

Para la inoculación de las bacterias, los ratones fueron anestesiados de manera subcutánea en la pata trasera izquierda. Una vez que el animal estaba inconsciente, se preparó la parte ventral del cuello para la intervención quirúrgica: con una incisión transversal en dicha zona la suspensión bacteriana fue inoculada por vía endotraqueal. Posteriormente, se suturó la herida abierta y se observó al animal para constatar su recuperación tras la intervención (357).

3.7.3 Análisis de los parámetros derivados de la infección pulmonar

3.7.3.1 Recuento bacteriano

En pulmones de los ratones control a las 24 horas después de la infección: una vez sacrificado al animal, se extrajeron sus pulmones. Éstos se conservaron a 4°C en 2ml de PBS hasta que fueron procesados. A continuación, se sembraron diluciones de los triturados de pulmón en placas de LB-agar durante 24 horas a 37°C. Al día siguiente, mediante un recuento bacteriano se comprobó la colonización del pulmón por las diferentes cepas de *P. aeruginosa*.

En pulmones de los ratones vivos a los 7 días tras la infección: este recuento se llevó a cabo sólo en los ratones con infección crónica que siguieron vivos a los 7 días después de la infección. Los animales fueron sacrificados y el recuento bacteriano se realizó en un triturado del pulmón derecho.

3.7.3.2 Extracción de lavado broncoalveolar (BAL)

A las 48 horas después de la infección, los pulmones de los ratones sometidos a infección aguda se perfundieron vía endotraqueal con una cánula con aproximadamente 1ml de PBS estéril y recuperando el flujo mediante aspiración. El fluido se centrifugó 10 minutos a 4°C a 100g, y el sobrenadante se trató con 0.1mM de PMSF y 5mM de EDTA. A continuación, se filtró con filtros de 22 μ m y se mantuvo a -70°C hasta su análisis. Sobre estas alícuotas se llevó a cabo la

cuantificación de citoquinas pro-inflamatorias. El precipitado se resuspendió en 200 μ l de PBS y se llevó a cabo un recuento bacteriano (357).

3.7.3.3 *Histopatología del pulmón*

A los 7 días después de la infección crónica se sacrificaron los animales vivos. Su pulmón derecho se preparó para recuento bacteriano. El pulmón izquierdo se mantuvo a temperatura ambiente en 5ml de formaldehído y se envió al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Son Dureta (Palma de Mallorca) para el análisis de marcadores de la inflamación: tipo de infiltrado celular y presencia de exudado en vías respiratorias y tejido pulmonar.

4 Resultados

4.1 Selección de mutantes con cambios en la sensibilidad a los antibióticos.

Dado que, al menos en los países desarrollados, los individuos que sufren una infección reciben tratamiento antibiótico, la capacidad de una bacteria para producir infección depende tanto de su virulencia como de su baja sensibilidad a los antimicrobianos (217). A pesar de que se asume que la adquisición de resistencia conlleva una disminución de la capacidad competitiva de las bacterias (*fitness cost*), se desconoce en gran medida si existen determinantes implicados simultáneamente en ambos fenotipos. Para tratar de determinar la existencia de posibles redes que interconecten los fenotipos de sensibilidad a los antibióticos y de virulencia hemos trabajado con el modelo *P. aeruginosa*. Para la búsqueda de genes implicados simultáneamente en ambos fenotipos hemos utilizado dos genotecas de inserción derivadas de dos cepas diferentes de *P. aeruginosa* (77, 374).

Los mutantes analizados derivan de dos cepas que fueron obtenidas de muestras clínicas. La cepa 59.20 fue caracterizada por primera vez por Meyer y cols. en 1997 (237). Es una estirpe de *P. aeruginosa* catalogada como productora de pioverdina tipo III. Como veremos a continuación se trata de una cepa con CMI (especialmente, en antibióticos β -lactámicos) superiores a las descritas para otras estirpes silvestres como PAO1 o PA14. Por otro lado, la cepa TB10839 pertenece a la línea clonal TB, y fue aislada del esputo de un individuo con FQ (353). Está descrita como una estirpe productora de gran número de factores de virulencia, entre los que destacan fenazinas y sideróforos. En ensayos de infección con ratones, esta cepa es más virulenta que PAO1, y es además patogénica en otros modelos animales como *Drosophila melanogaster* y *C. elegans*.

Tabla 4: Sensibilidad a los antibióticos* de cepas silvestres de *P. aeruginosa* utilizados en esta Tesis.

Cepa	Polimixina	Amicacina	Ciprofloxacino	Tetraciclina	Imipenem	Ceftazidima
59.20	2	2	0,06	8-16	16-32	2
TB	2-4	2-4	0,06	16	8	2
PAO1	2	1	0,06	16	2	0,5
PA14	0,5	2	0,03	4	2	0,25

*CMI ($\mu\text{g/ml}$)

Para identificar elementos implicados en la sensibilidad a los antibióticos de *P. aeruginosa*, hemos analizado la sensibilidad de los distintos mutantes de inserción frente a seis antimicrobianos diferentes. Se utilizaron antibióticos pertenecientes a distintas familias estructurales: a) que actúan a nivel de la pared bacteriana: carbapenemas (imipenem) y cefalosporinas (ceftazidima), b) a nivel de la síntesis de proteínas: aminoglicósidos (amicacina) y tetraciclinas (tetraciclina), c) a nivel de la permeabilidad de la membrana celular: polimixinas (polimixina B), y d) a nivel del metabolismo de los ácidos nucleicos: quinolonas (ciprofloxacina). 222 mutantes de los 5952 analizados (un 3,7% del total de mutantes) presentaron cambios en su sensibilidad a uno o varios antibióticos en comparación con la estirpe silvestre.

En la Figura 8, se muestran los resultados de este estudio. Para poder hacer un análisis global de dichos resultados, los valores de CMI se normalizaron respecto a los correspondientes

de la estirpe silvestre, se obtuvo el \log_2 de dicho valor para que los valores cuantitativos de aumento o disminución de sensibilidad fueran simétricos, y se agruparon estos valores mediante *Hierarchical Clustering* tal y como se indica en Materiales y Métodos.

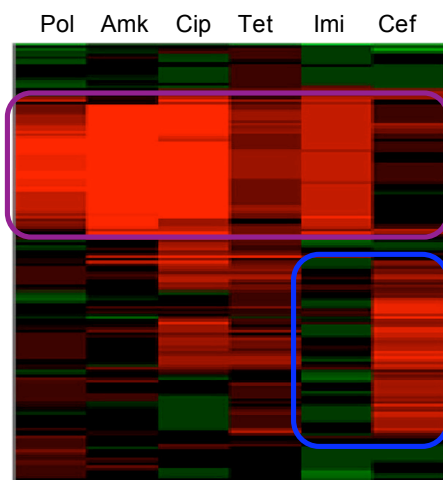


Figura 8: Sensibilidad a los antibióticos de los mutantes de *P. aeruginosa*. Cada columna del gráfico representa un antibiótico: Pol: Polimixina B. Amk: Amicacina. Cip: Ciprofloxacina. Tet: Tetraciclina. Imi: Imipenem. Cef: Ceftazidima. En el eje de ordenadas están representados cada uno de los 222 mutantes con variaciones en sensibilidad a los antibióticos con respecto a su silvestre. Los datos se muestran como relaciones de sensibilidad de cada mutante en comparación con su cepa silvestre. Estas relaciones se obtienen aplicando la siguiente fórmula: \log_2 [CMI mutante/CMI silvestre]. Los resultados de esta ecuación están agrupados utilizando los programas informáticos: GeneCluster y TreeView disponibles en: <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>. En verde se muestran los mutantes más sensibles a los antibióticos en comparación con su isogénica silvestre y, en rojo los mutantes menos sensibles que su cepa silvestre. En negro, cuando no hay cambios de CMI con respecto a su silvestre.

En la Figura 8 se muestran los cambios en la sensibilidad a los antibióticos de los mutantes con respecto a sus cepas silvestres. Como se puede observar, existen dos fenotipos que se repiten en un alto número de mutantes: un descenso de la sensibilidad a todos los antibióticos simultáneamente (destacado en malva) y, por otro lado, un aumento de la sensibilidad a imipenem junto con una disminución de la sensibilidad a ceftazidima (señalado en azul).

La mayor parte de las mutaciones observadas producen cambios en la sensibilidad a uno o varios antibióticos. Esto nos indica que la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* es, en gran medida, inespecífica. En la Figura 9, se hace una comparación del número de mutantes que, con respecto a su cepa silvestre, son menos sensibles simultáneamente a un número dado de antibióticos y el número de mutantes que son más sensibles simultáneamente a uno o varios antibióticos.

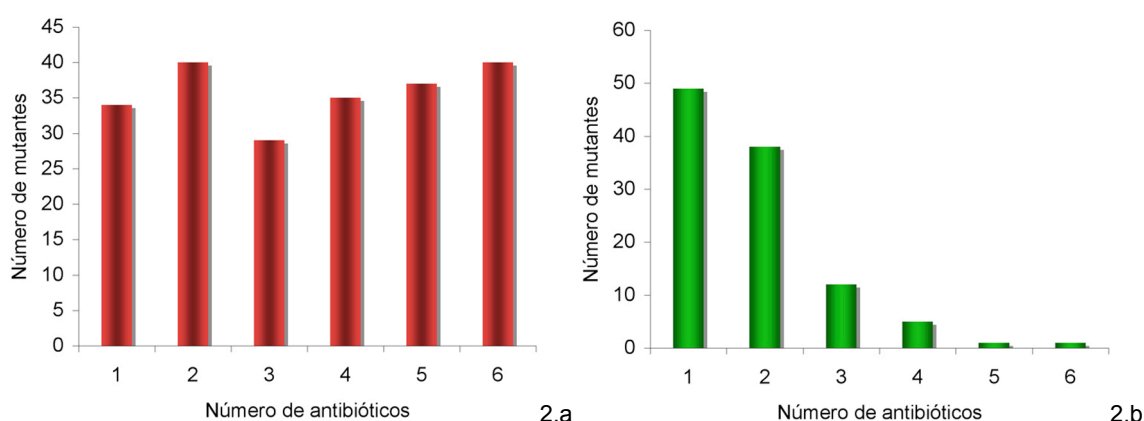


Figura 9. Sensibilidad a los antibióticos de los mutantes de *P. aeruginosa*. 2.a.: Número de mutantes que son menos sensibles, en comparación con su cepa silvestre, simultáneamente a un número de antibióticos dado. 2.b.: Número de mutantes que son mas sensibles, en comparación a su cepa silvestre, simultáneamente a un número de antibióticos dado.

Como muestra la Figura 2.a, muchos mutantes eran menos sensibles a alguno de los antibióticos: un 18% del total eran menos sensibles que la cepa silvestre a todos los

antimicrobianos analizados y sólo un 3,1% de los mutantes no presentaba una sensibilidad menor que el silvestre a ninguno de los antibióticos (Figura 2.a). Las mutaciones en estos genes podrían permitir a *P. aeruginosa* adquirir nuevas resistencias durante el tratamiento. Por otro lado, sólo algunos de los mutantes eran más sensibles a los antibióticos que su estirpe silvestre: más del 50% del total no experimentaban una sensibilidad mayor a ninguno de los antibióticos que la cepa silvestre, el 22,5% eran más sensibles a un antibiótico y el 18% eran más sensibles a dos antibióticos que la estirpe silvestre (Figura 2.b). Estos genes mutados definirían nuevas dianas para el desarrollo de nuevos antibacterianos. Al contrario del alto porcentaje de mutantes menos sensibles a todos los antibióticos simultáneamente (40 de 222 mutantes seleccionados), sólo uno de los mutantes fue más sensible que la cepa silvestre a todos los antibióticos a la vez. Esto nos indicaría, no sólo que hay un buen número de elementos implicados en la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa*, sino también, que la capacidad de esta bacteria para adquirir resistencia por mutación es muy elevada.

4.2 Análisis de la citotoxicidad de los mutantes con sensibilidad a los antibióticos alterada

Dado que el objetivo de nuestro trabajo es la búsqueda de genes implicados simultáneamente en resistencia a los antibióticos y la virulencia de *P. aeruginosa*, analizamos la citotoxicidad de los distintos mutantes como marcador de virulencia. Este análisis se llevó a cabo, tal y como se explica en Materiales y Métodos, usando como modelo de infección la línea celular de macrófagos de ratón J774. De un total de 222 mutantes con cambios en la sensibilidad a los antibióticos, 113 presentaron variaciones en citotoxicidad. De estos mutantes, 62 eran más citotóxicos y 51 presentaban una menor citotoxicidad que su estirpe silvestre (Tabla 5).

Tabla 5: Número de mutantes con variaciones en sensibilidad a los antibióticos y citotoxicidad simultáneamente

Cepa silvestre	Número de mutantes con cambios en su CMI	Número de mutantes más citotóxicos	Número de mutantes menos citotóxicos
59.20	113	33	33
TB	109	29	18

En la genoteca obtenida a partir de la estirpe silvestre 59.20, de los 113 mutantes que presentaban cambios en la sensibilidad a los antibióticos, el 29,2% de los mismos era más citotóxico que la cepa silvestre. El mismo porcentaje de mutantes (29,2%) era menos citotóxico que 59.20. En la genoteca generada en la cepa TB, el porcentaje de mutantes más citotóxicos fue mayor (26,6%) que el porcentaje de mutantes menos citotóxicos (16,2%), dentro de los mutantes que presentaban cambios en la sensibilidad a los antibióticos con respecto a la cepa silvestre.

Para poder estudiar de un modo conjunto los cambios en sensibilidad y citotoxicidad de los mutantes se hizo un análisis global de los resultados (Figura 10) de modo semejante a como se describe en el apartado 4.1 de Resultados.

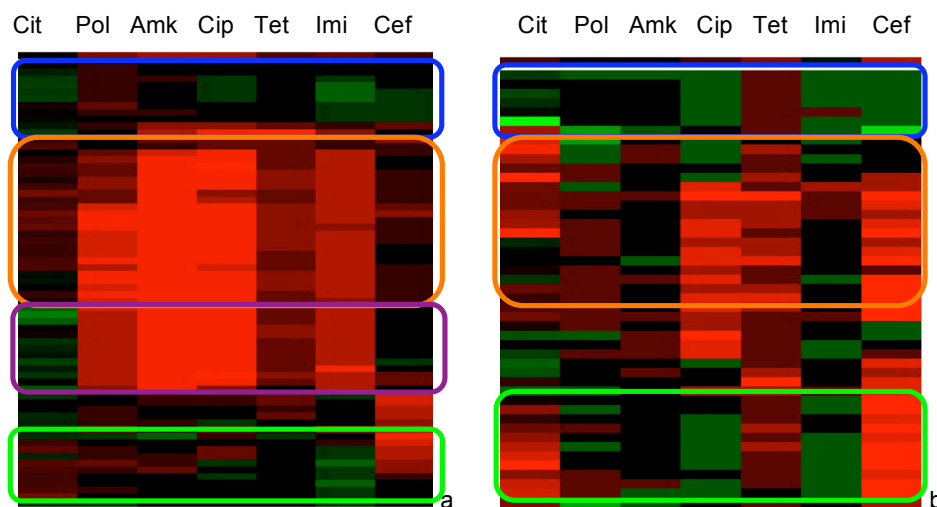


Figura 10. Análisis de citotoxicidad y valores de CMI de los mutantes de *P. aeruginosa*. 3.a.: Fenotipo de los mutantes de la genoteca 59.20. 3.b.: Fenotipo de los mutantes de la genoteca TB. Cada columna muestra, en código de colores los resultados de citotoxicidad y sensibilidad a los antibióticos de cada mutante con respecto a la estirpe silvestre. Los valores se obtienen aplicando la fórmula siguiente: $\log_2 [\text{valor mutante/valor silvestre}]$, y se agrupan utilizando los programas informáticos Gene cluster y TreeView disponibles en: <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>. En verde, se representan valores de citotoxicidad y CMI menores que los de la estirpe silvestre. En rojo, los mutantes con valores de citotoxicidad y CMI superiores a los de su isogénica silvestre. Cit: Citotoxicidad. Pol: Polimixina B. Amk: Amicacina. Cip: Ciprofloxacina. Tet: Tetraciclina. Imi: Imipenem. Cef: Ceftazidima.

En el apartado (a) de la Figura 10 se representan los cambios simultáneos en citotoxicidad y sensibilidad a los antibióticos de los mutantes de la genoteca 59.20. En esta genoteca la mayoría de los mutantes presentan una disminución de la sensibilidad a todos los antibióticos con respecto a su cepa silvestre 59.20. Dentro de este grupo de mutantes menos sensibles que la estirpe silvestre se observa que hay tanto mutantes más citotóxicos (señalado en naranja) como mutantes menos citotóxicos (destacado en malva) que su isogénica silvestre. Por otro lado, hay una correlación entre cambios en la sensibilidad a ceftazidima y la citotoxicidad: los mutantes que son menos sensibles a ceftazidima y más sensibles a imipenem que 59.20 son más citotóxicos (cuadro verde); y a la inversa, los mutantes más sensibles a ceftazidima e imipenem son menos citotóxicos que la estirpe silvestre (cuadro azul).

En el apartado (b) de la Figura 10 se muestran los cambios simultáneos en citotoxicidad y sensibilidad a los antibióticos de los mutantes de la genoteca TB. En esta genoteca, al igual que sucede con la genoteca 59.20, parece existir una correlación entre variaciones en la sensibilidad a ceftazidima y la citotoxicidad: la disminución de la sensibilidad a este antibiótico está presente en la mayoría de los mutantes que son más citotóxicos que TB (señalado en naranja), mientras que los mutantes menos citotóxicos tienden a ser más sensibles a ceftazidima que la cepa silvestre (cuadros azul y verde).

4.3 Determinación del lugar de inserción del transposón

Para conocer el gen donde se había producido la inserción del transposón en los distintos mutantes seleccionados se amplificaron las regiones adyacentes al lugar donde se había insertado el transposón en 168 de los 222 mutantes con cambios en sensibilidad a los antibióticos mediante PCR inversa, tal y como se describe en Materiales y Métodos (de las 54

secuencias restantes no obtuvimos amplificación). Estas regiones se secuenciaron y se compararon con la base de datos del genoma de *P. aeruginosa* PAO1 (www.pseudomonas.com). En la Tabla 6 se muestran los genes en los que se localizó el transposón.

Tabla 6: Genes cuya mutación produce cambios en la sensibilidad a los antibióticos de *P. aeruginosa*

PA *	Nombre del gen y función	Categoría funcional **	CMI (µg/ml)					
			Pol	Amk	Cip	Tet	Imi	Cef
59.20	Cepa silvestre		2	2	0,06	8-16	16	2
3551	<i>algA</i> : biosíntesis de Alginato	1, 8, 26	8	128	0,5	64	256	4
5263	<i>argH</i> : argininosuccinato liasa.	2	32	128	4	128	256	2
1326 y 0331	PA1326: <i>ilvA2</i> : treonina deshidratasa. PA0331: <i>ilvA1</i> : treonina deshidratasa	2	2	4	0,25	64	32	4
3570	<i>mmsA</i> : metilmalonato - semialdehído deshidrogenasa	2, 6	128	128	4	128	128	4
1727	<i>mucR</i> : regulador de la biosíntesis de alginato	4, 8	8	64	4	64	256	4
4367	<i>bifA</i> : relacionada en transducción de señales, 4 y adherencia a superficies.	4, 8	16	64	4	64	256	2
2265	<i>gad</i> : gluconato dehidrogenasa	6	32	128	4	128	256	2
3195	<i>gapA</i> : gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	6, 13	8	128	4	64	256	4
3337	<i>rfaD</i> : ADP-L-glicero-D-manoheptosa 6-epimerasa	8	256	128	4	64	256	4
2194	<i>hcnB</i> : hidrógeno cianida sintasa HcnB	9	64	128	4	128	256	8
4130	Posible sulfito o nitrito reductasa	9	128	128	1	64	256	4
2664	<i>fhp</i> : flavohemoproteína	13	4	128	4	64	256	2
0071	Proteína hipotética	15	8	2	0,06	8-16	8	1
0498	Proteína hipotética	15	64	128	4	128	256	2
0599	Proteína hipotética	15	32	128	4	64	1024	2
0690	Proteína hipotética	15	64	128	4	128	256	4
1031	<i>yigN</i> : proteína hipotética conservada	15	16	128	4	128	256	4
3731	<i>yjfJ</i> : proteína hipotética conservada .	15	128	128	4	128	256	16
4163	Proteína hipotética: Asp-tRNAAsn/Glu-tRNA ^{Gln} amidotransferasas	15	2	8	0,25	64	32	16
4523	Proteína hipotética.	15	64	128	4	128	256	2
4686	Proteína hipotética	15	32	128	4	64	256	4
4691	Proteína hipotética	15	32	128	8	128	256	8
5184	Proteína hipotética.	15	2	32	4	2048	128	2
5208	Proteína hipotética conservada	15	4	2	0,06	64	16	32
5307	Proteína hipotética	15	8	2	0,06	8-16	8	1
5433	Proteína hipotética conservada	15	4	2	0,25	64	32	4

5457	Proteína hipotética.	15	4	2	0,03	8-16	4	1
5540	Proteína hipotética implicada en catabolismo de fenilacetato	15	64	128	4	128	256	4
4511	Proteína hipotética conservada	15, 16	4	2	0,06	8-16	8	1
4747	<i>secG</i> : proteína de secreción SecG.	16, 18	32	128	4	64	256	8
0809	Posible transportador de Mn ²⁺ y Fe ²⁺ de la familia NRAMP	16, 24	128	128	4	64	256	4
1048	Posible precursor de proteína de membrana externa	16, 24	8	128	4	128	256	4
2522	<i>czcC</i> : precursor de proteína de membrana externa	16, 24	64	128	4	128	256	4
3877	<i>nark1</i> : proteína expulsión de nitritos.	16, 24	64	128	4	64	128	4
3096	<i>xcpY</i> : proteína L de la vía general de secreción	18	1	2	0,06	8-16	8	2
1821	Enoil-CoA hidratasa/isomerasa.	19	4	16	0,5	64	32	8
1856	Posible subunidad citocromo oxidasa	19	32	128	2	64	256	4
3723	<i>yqjM</i> : posible FMN oxidorreductasa.	19	8	128	4	128	256	4
4131	Posible proteína hierro-azufre del complejo IV de la cadena respiratoria.	19	128	128	4	64	256	2
4715	<i>yfdZ</i> : posible aminotransferasa	19	8	2	0,06	8-16	8	1
5190	Posible nitrorreductasa	19	4	4	0,03	8-16	8	2
5542	Proteína hipotética: con dominio Beta-lactamasa y de otras proteínas de unión a penicilinas	19	2	2	0,06	8-16	8	1
1738	Posible regulador transcripcional.	22	16	128	4	64	256	2
4787	Posible regulador transcripcional	22	32	128	4	128	256	16
2973	Posible peptidasa de la familia de las serín proteasas.	23	2	4	0,12	64	16	64
1410	<i>potF1</i> : posible proteína periplásmica de unión a espermidina/putrescina	24	8	128	4	128	256	4
4112	Posible híbrido sensor/regulador de respuesta	25	128	128	4	128	256	4
5484	<i>kinB</i> : posible sensor de dos componentes (histidina quinasa)	25	64	128	4	128	256	4
3319	<i>plcN</i> : precursor de fosfolipasa C no hemolítica	26	32	128	4	64	256	1
Entre PA0599 y PA0600	<i>PA0599</i> : proteína hipotética. <i>PA0600</i> : posible sensor de dos componentes.	28	128	128	4	64	256	2
Entre PA4654 y PA4655	<i>PA4654</i> : posible transportador MFS. <i>PA4655</i> : <i>hemH</i> : ferroquelatasa	28	8	128	0,5	8-16	256	2
Entre PA4805 y PA4806	<i>PA4805</i> : posible aminotransferasa de clase III. <i>PA4806</i> : posible regulador transcripcional	28	64	128	4	64	256	2
Entre PA5410 y PA 5411	<i>PA5410</i> : <i>gbcA</i> y <i>PA5411</i> : <i>gbcB</i> : catabolismo de glicina-betaína	28	128	128	4	128	256	4

PALES_25841	<i>pltC</i> . Poliquétido sintasa tipo I de <i>P. aeruginosa</i> LESB58	29	4	8	0,06	8-16	8	16
PA ⁺	Nombre del gen y función	Categoría funcional **	CMI (µg/ml)					
			Pol	Amk	Cip	Tet	Imi	Cef
TB	Cepa silvestre		2-4	2-4	0,06	16	8	2
2424	<i>pvdL</i> : biosíntesis de sideróforos	1	0,5	1	0,03	32	32	4
4468	<i>sodM</i> . superóxido dismutasa	1	2-4	2-4	0,5	64	4	8
5372	<i>betA</i> : colina deshidrogenasa.	1, 2	0,5	1	0,06	32	8	8
0997	<i>pqsB</i> : biosíntesis de la molécula de quórum sensing PQS	2	2-4	2-4	0,03	32	8	16
4919	<i>pncB1</i> . nicotinato fosforribosil transferasa	2	2-4	16	0,5	128	4	64
4598	<i>mexD</i> : transportador tipo RND	3, 16, 24	0,5	2-4	0,03	16	4	2
4552	<i>pilW</i> : proteína de ensamblaje de pili	4	1	2-4	0,25	32	4	2
3704	<i>wspE</i> : proteína fusión sensor/efector implicado en modulación intracelular de los niveles de diGMPc.	4, 11, 25	2-4	2-4	0,03	32	4	32
1311	<i>phnX</i> : 2-fosfoacetaldehído hidrolasa.	6	2-4	8	0,5	32	4	2
2574	<i>alkB1</i> : alcano-1-monooxigenasa	6	8	1	0,03	16	4	64
5349	Posible rubredoxin reductasa	6	2-4	2-4	0,03	32	4	2
1931	Posible ferredoxina	6, 13	4	2	0,06	8-16	8	1
4234	<i>uvrA</i> . subunidad A de la excinucleasa ABC.	12	8	8	0,5	32	4	64
3924	Acil CoA ligasa de ácidos grasos de cadena media: acil CoA sintetasa	14	2-4	1	0,5	128	8	32
0049	Proteína hipotética	15	1	2-4	0,03	32	8	8
0290	Proteína hipotética	15	8	2-4	0,5	64	4	4
0788	Proteína hipotética	15	8	8	0,5	128	8	16
0856	Proteína hipotética	15	2-4	2-4	0,03	32	4	1
1076	Proteína hipotética	15	8	2-4	0,03	64	8	32
3300	<i>fadD2</i> : acil CoA ligasa de ácidos grasos de cadena larga	14	2-4	2-4	0,03	16	8	16
3329	Proteína hipotética	15	1	8	0,03	32	4	2
3472	Proteína hipotética	15	8	2-4	0,25	64	16	16
3728	Proteína hipotética	15	8	2-4	0,06	32	8	8
3756	<i>yafK</i> : proteína hipotética	15	1	2-4	0,5	32	4	1
4631	Proteína hipotética.	15	2-4	2-4	0,03	32	4	1
4632	Proteína hipotética	15	1	1	0,03	32	4	1
5208	Proteína hipotética conservada	15	2-4	2-4	0,03	32	4	16
1408	Proteína hipotética.	15, 16	8	2-4	0,5	128	8	64
3893	Proteína hipotética conservada	15, 16	2-4	2-4	0,03	32	8	16

4507	Proteína hipotética	15, 16	1	2-4	0,5	32	32	8
5528	Proteína hipotética	15, 16	8	1	0,03	32	8	8
4008	Posible hidrolasa	16, 19	2-4	2-4	0,03	32	4	1
1436	Posible transportador tipo RND	16, 24	2-4	2-4	0,03	32	4	1
2006	Posible transportador tipo MFS	16, 24	8	2-4	0,25	64	8	32
2435	ATPasa transportadora de cationes	16, 24	8	8	0,03	32	4	32
2527	<i>yegN</i> : posible transportador tipo RND	16, 24	1	8	2	32	8	1
5097	<i>hutT</i> : posible aminoácido permeasa	16, 24	2-4	2-4	0,06	32	4	64
5529	Posible transportador sodio/protones	16, 24	8	2-4	0,25	64	8	8
0849/2616	<i>PA0849: trxB2</i> : tiorredoxin reductasa 2. <i>PA2616: trxB1</i> : tiorredoxin reductasa 1	17	2-4	2-4	0,5	32	4	4
0842	Posible glicosil transferasa.	19	2-4	2-4	0,03	32	4	1
0863	Posible oxidorreductasa	19	2-4	2-4	0,5	16	4	8
1997	Posible enzima de unión a AMP	19	0,5	1	0,06	32	4	0,25
3328	Posible monooxigenasa FAD-dependiente	19	8	2-4	0,5	128	4	64
4785	Posible Acil-CoA tiolasa.	19	2-4	1	0,03	32	4	1
4889	Posible oxidorreductasa	19	2-4	2-4	1	32	16	16
1759	Posible regulador transcripcional	22	8	2-4	0,5	64	8	16
2591	Posible regulador transcripcional	22	1	2-4	0,03	64	4	32
5380	<i>gbdR</i> : posible regulador transcripcional.	22	8	2-4	0,06	32	8	2
0619	Posible proteína relacionada a bacteriófago	20	2-4	2-4	0,06	32	8	1
3434	Posible transposasa.	20	2-4	2-4	0,25	64	16	8
5474	Posible metaloproteasa.	23	8	2-4	0,5	128	8	8
0958	<i>oprD</i> . Porina específica de aminoácidos péptidos básicos e imipenem	24	2-4	2-4	0,5	32	64	2
2760	<i>oprQ</i> : posible precursor de proteína de membrana externa.	24	64	128	4	128	256	4
4913	Proteína de unión: componente de transportador tipo ABC.	24	8	2-4	0,5	128	8	32
0464	<i>creC</i> . Sensor de dos componentes	25	1	2-4	0,06	32	4	64
Entre PA2751 Y PA2752	<i>PA2751: yfkH</i> : proteína hipotética. <i>PA2752: yqaA</i> : proteína hipotética.	28	2-4	2-4	0,03	32	16	1
Entre PA3450 Y PA3451	<i>PA3450: lsfA</i> : posible proteína antioxidante. <i>PA3451</i> : proteína hipotética	28	8	2-4	0,25	64	8	64
Entre PA2460 y PA2461	<i>PA2460</i> : proteína hipotética. <i>PA2461</i> : proteína hipotética	28	2-4	8	0,06	64	8	8
Entre PA5028 y PA5029	<i>PA5028</i> : proteína hipotética conservada. <i>PA5029: ynfL</i> : regulador transcripcional	28	1	2-4	0,03	32	4	1
PALES_23511	Proteína hipotética de <i>P. aeruginosa</i> LESB58	29	8	2-4	0,5	64	8	16

PALES_27011	<i>topA</i> : DNA topoisomerasa III. <i>P. aeruginosa</i> LESB58	29	8	2-4	0,5	64	8	16
Rsc1931	Posible proteína relacionada fago (hidrolasa) de <i>R. solacinarum</i> .	30	8	2-4	0,06	32	4	16
STM2714	Fels-2 prophage: similar a la proteína lítica lysB. <i>S. typhimurium</i>	30	8	8	0,25	32	16	32
XCC2973	Terminasa relacionada a fago. <i>X.campestris</i> ATCC33913	30	2-4	2-4	0,06	256	8	16

*. Número de Identificación del gen como se define en www.pseudomonas.com

** . Categoría funcional de los genes como se define en www.pseudomonas.com. Los números en paréntesis hacen referencias a las categorías funcionales que se detallan en la Tabla 7. Genes que pertenecen a diferentes categorías funcionales

Después de filtrar las inserciones que se producen en el mismo gen, hemos determinado que al menos 118 loci del genoma de *P. aeruginosa* contribuyen a su fenotipo de sensibilidad a los antibióticos (Tabla 6).

De las inserciones descritas, 104 se localizan en genes presentes en la cepa silvestre PAO1, 8 se localizan en regiones intergénicas y 6 de ellas pertenecen a genes adquiridos por transmisión horizontal (de secuencias procedentes tanto de otras cepas de *Pseudomonas spp.* como de otras especies bacterianas). Los genes incluidos en la categoría de *P. aeruginosa* LESB58, presentaban una identidad del 100% con respecto a las secuencias génicas de esta cepa, y no se encuentran en el genoma de PAO1. Ya que el genoma de *P. aeruginosa* PAO1 contiene 5570 genes, nuestros resultados indican que al menos un 1,9% del genoma de este patógeno oportunista contribuye a su fenotipo característico de sensibilidad a los antibióticos. En la Tabla 7 se muestra el número de mutantes con cambios en la sensibilidad a los antibióticos agrupados según las categorías funcionales definidas para el genoma de *P. aeruginosa* PAO1, y el porcentaje que representan con respecto al número de genes de *P. aeruginosa* agrupados en cada categoría.

Tabla 7: Categorías funcionales de genes involucrados en la sensibilidad a los antibióticos de *P. aeruginosa*

Categorías funcionales*	Número de genes en el genoma de <i>P. aeruginosa</i> PAO1**	Mutantes con cambios en la sensibilidad a los antibióticos**
1) Adaptación, protección	170	4 (2.3%)
2) Biosíntesis y metabolismo de aminoácidos	226	3 (1.3%)
3) Resistencia y sensibilidad a los antibióticos	31	1 (3.2%)
4) Motilidad	112	4 (3.6%)
5) Biosíntesis de cofactores y grupos prostéticos.	159	2 (1.3%)
6) Catabolismo de compuestos de carbono.	173	21 (12.1%)
7) División celular	29	0 (-)
8) Pared celular / LPS / cápsula	136	3 (2.2%)
9) Metabolismo Central	99	2 (2.0%)
10) Chaperonas y proteínas de choque térmico	54	0 (-)

11) Quimiotaxis	64	1 (1.6%)
12) Replicación, recombinación, modificación y reparación del DNA	88	1 (1.1%)
13) Metabolismo energético	207	3 (1.4%)
14) Metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos.	62	2 (3.2%)
15) Proteínas hipotéticas, sin clasificar o desconocidas	2364	37 (1.6%)
16) Proteínas de membrana	676	21 (3.1%)
17) Metabolismo y biosíntesis de nucleótidos	81	1 (1.2%)
18) Proteínas de sistemas de secreción	99	2 (2.02%)
19) Posibles enzimas	477	14 (2.9%)
20) Genes relacionados con fagos, transposones o plásmidos.	65	2 (3.1%)
21) Genes de transcripción, procesamiento y degradación de RNA	55	0 (-)
22) Reguladores transcripcionales	473	5 (1.06)
23) Genes de traducción, modificaciones post-traduccionales y degradación.	195	2 (1.02%)
24) Transporte de pequeñas moléculas	595	16 (2.7%)
25) Sistemas reguladores de dos componentes	121	4 (3.3%)
26) Factores secretados (toxinas, enzimas, alginato)	88	2 (2.3%)
27) RNA no codificante	97	0 (-)
28) Regiones intergénicas	-	8 (-)
29) Genes que pertenecen a <i>P. aeruginosa</i> LESB58	-	3 (-)
30) Genes que no pertenecen a <i>Pseudomonas</i> spp.	-	3 (-)

*. Categoría funcional de los genes como se define en www.pseudomonas.com

**. Algunos genes que pertenecen a diferentes categorías funcionales

De entre los 118 loci, sólo *mexD* (un componente de un sistema MDR) (276), y *oprD* (una porina de membrana externa) (271, 351, 397) han sido previamente anotados como genes clásicos de resistencia a los antibióticos. Además, durante la escritura de esta tesis se caracterizó una bomba tipo RND (MuxABC-OmpB) a la que pertenece otro de los genes identificados en nuestro estudio (PA2527) (241). Aunque para algunos otros, como los posibles transportadores MDR PA1436 (transportador tipo RND) y PA2006 (transportador tipo MFS) se ha predicho que pueden tener un papel en la resistencia de *P. aeruginosa*, la gran mayoría de los genes catalogados en nuestro estudio no han sido previamente identificados como implicados en resistencia a los antibióticos en esta especie bacteriana. Por tanto, nuestro trabajo revela un resistoma intrínseco desconocido hasta ahora en *P. aeruginosa* (102).

Igualmente, al analizar los genes con un papel simultáneo en resistencia y virulencia, sólo PA3319 (fosfolipasa C no hemolítica) (331) y PA3551 (*algA*, gen implicado en la biosíntesis de alginato) (225, 323) codifican factores de patogenicidad clásicos de la bacteria. Sin embargo, en nuestro estudio se identificaron otros genes relacionados con la biosíntesis de alginato y que por

tanto podrían tener un papel en los cambios en virulencia. Tal es el caso de la proteína sensor quinasa KinB, de la que se ha demostrado recientemente su implicación en la regulación negativa de la producción de alginato (68, 209). Otra proteína relacionada con la síntesis de alginato es MucR, que regula la biosíntesis de dicho exopolímero controlando los niveles intracelulares de di-GMP cíclico (142, 181). Por otro lado, se ha sugerido que una porina identificada en nuestro estudio, OprQ, de la misma familia que OprD, pueda estar involucrada en virulencia ya que hay estudios que demuestran que esta proteína en la especie *P. fluorescens* es capaz de unir fibronectina (284). Otro gen que aparece en nuestro estudio es PA0997, que codifica *pqsB*, perteneciente al operón *pqsABCDE*, implicado en la biosíntesis de PQS (119). Esta molécula señal forma parte del sistema QS de *P. aeruginosa* (231, 273). Este sistema es una compleja red de regulación que, como se describe en la Introducción, controla la producción de metabolitos secundarios y factores de virulencia en este patógeno (190, 316, 359, 363). El resto de secuencias identificadas pertenecen a categorías funcionales muy variadas.

El fenotipo de virulencia y resistencia a los antibióticos de *P. aeruginosa* engloba por tanto una compleja red de elementos que incluyen genes no clásicos de resistencia y virulencia.

4.4 Expresión del Sistema de Secreción Tipo III en los mutantes con cambios en sensibilidad a los antibióticos y citotoxicidad

El T3SS es un elemento clave en la citotoxicidad de *P. aeruginosa* (65, 151, 157, 305). Con el objetivo de determinar si los resultados obtenidos en los ensayos realizados en la línea celular de macrófagos de ratón J774 se correlacionan con cambios en la T3S, se analizó la secreción de proteínas del T3SS en los mutantes con cambios simultáneos en sensibilidad a los antibióticos y citotoxicidad. A través de este aparato se secretan las proteínas de translocación y las proteínas efectoras. Las proteínas de translocación PopB y PopD se insertan en la membrana de la célula huésped, siendo la proteína PcrV la responsable de la formación del poro (66). A través del canal que forman PopB, PopD y PcrV en la membrana de la célula huésped, se produce la introducción de las proteínas efectoras: ExoS, ExoT, ExoY y ExoU (66). Estas proteínas se visualizaron por tinción con plata tal y como se indica en Materiales y Métodos, y su identificación se hizo por MALDI-TOF en las cepas silvestres 59.20, TB, PAO1 y PA14.

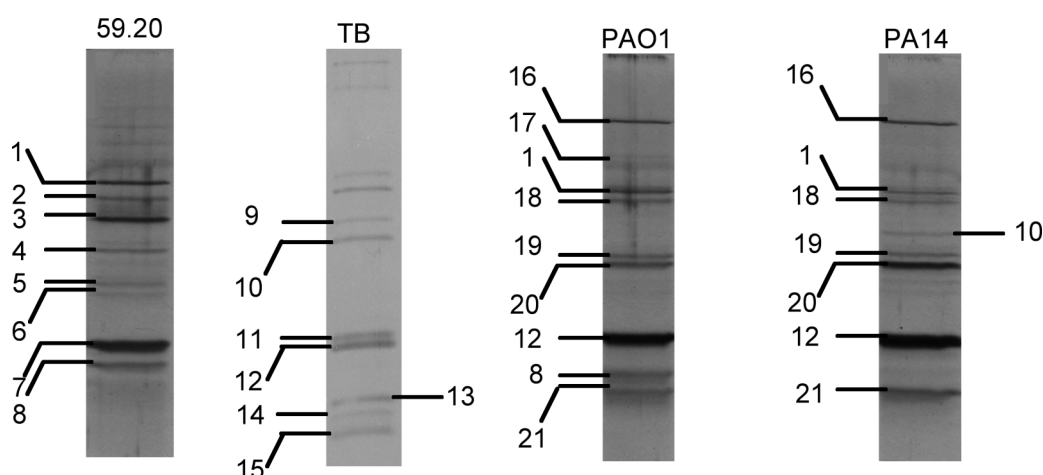


Figura 11: Identificación por MALDI-TOF de proteínas secretadas en condiciones de T3S.

Tabla 8: Identificación de proteínas secretadas en condiciones de T3S

Nº	Proteína identificada*	59.20	TB	PAO1	PA14
----	------------------------	-------	----	------	------

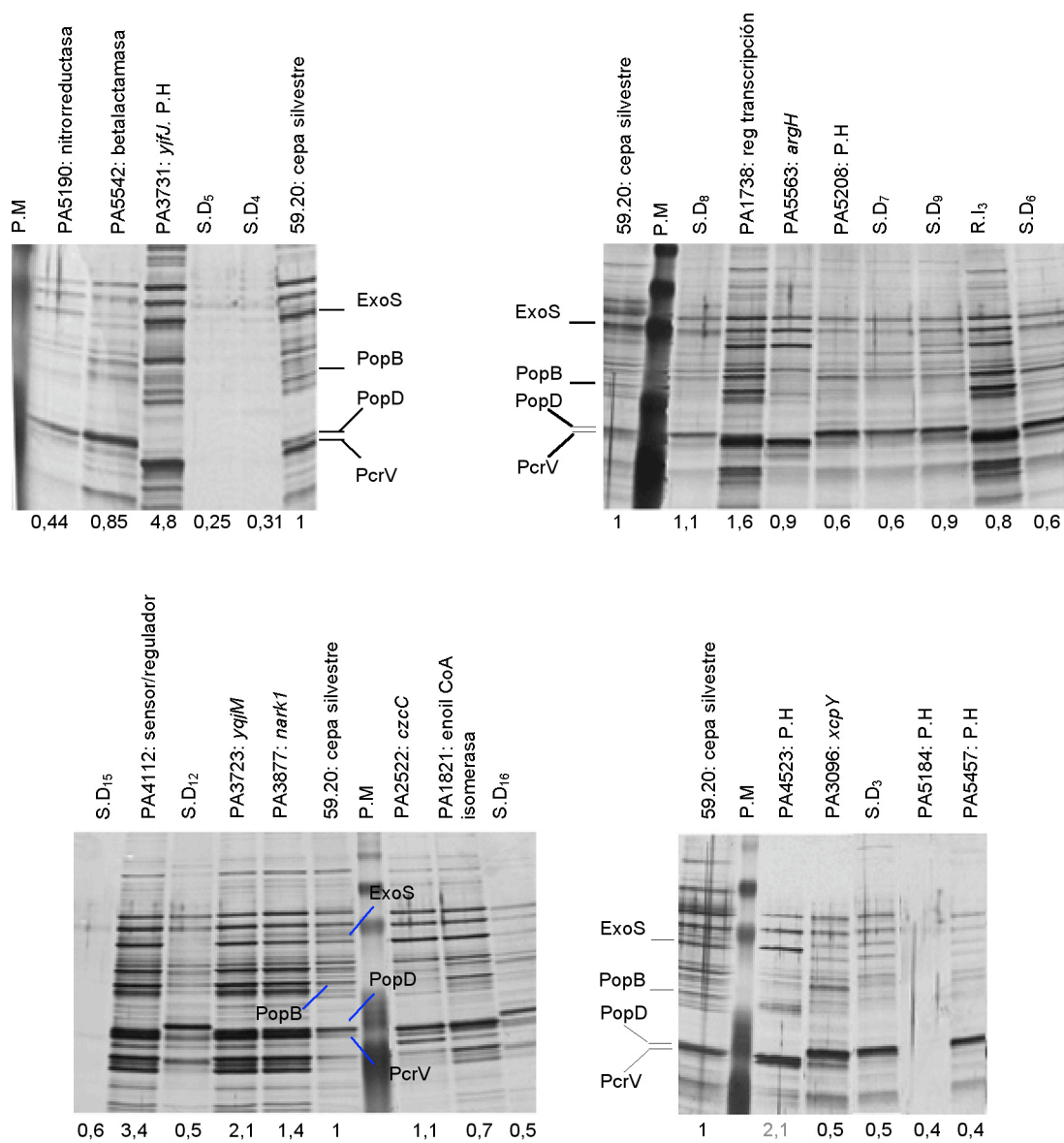
1	PaerPA_01001051: proteína hipotética de <i>P. aeruginosa</i> PACS2. 100% identidad GroEL de <i>P. aeruginosa</i>	x		x	x
2	Piruvato descarboxilasa de <i>P. stutzeri</i> A1501	x			
3	Exoenzima S de <i>P. aeruginosa</i>	x			
4	Factor de elongación Tu de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	x			
5	Proteína de translocación PopB de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	x			
6	Proteína hipotética PA2G_05847 de <i>P. aeruginosa</i> 2192	x			
7	Precursor de proteína de translocación de membrana externa PopD de <i>P. aeruginosa</i>	x			
8	Proteína de Secreción Tipo III PcrV de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	x		x	
9	Precursor de proteína DsbA de <i>P. aeruginosa</i>		x		
10	Proteasa IV de <i>P. aeruginosa</i>		x		x
11	PA1342: posible componente de transportador tipo ABC		x		
12	Cadena A, elastasa con inhibidor de <i>P. aeruginosa</i>		x	x	x
13	Proteína transportadora de poliaminas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1		x		
14	Posible componente de transportador de azúcares tipo ABC de <i>P. aeruginosa</i> PAO1		x		
15	BraC: proteína transportadora de aminoácidos de <i>P. aeruginosa</i> PAO1				
16	Proteína hipotética PA0572 de <i>P. aeruginosa</i> PAO1			x	x
17	Precursor de exotoxina A de <i>P. aeruginosa</i> C3719			x	
18	Posible aminopeptidasa de <i>P. aeruginosa</i>			x	x
19	Proteína de bacteriófago de <i>P. aeruginosa</i>			x	x
20	Precursor de proteína de unión a quitina CbpD de <i>P. aeruginosa</i> PAO1			x	x
21	Proteína hipotética PaerPA_01004763 de <i>P. aeruginosa</i> PACS2. 99% Proteasa IV de <i>P. aeruginosa</i>			x	x

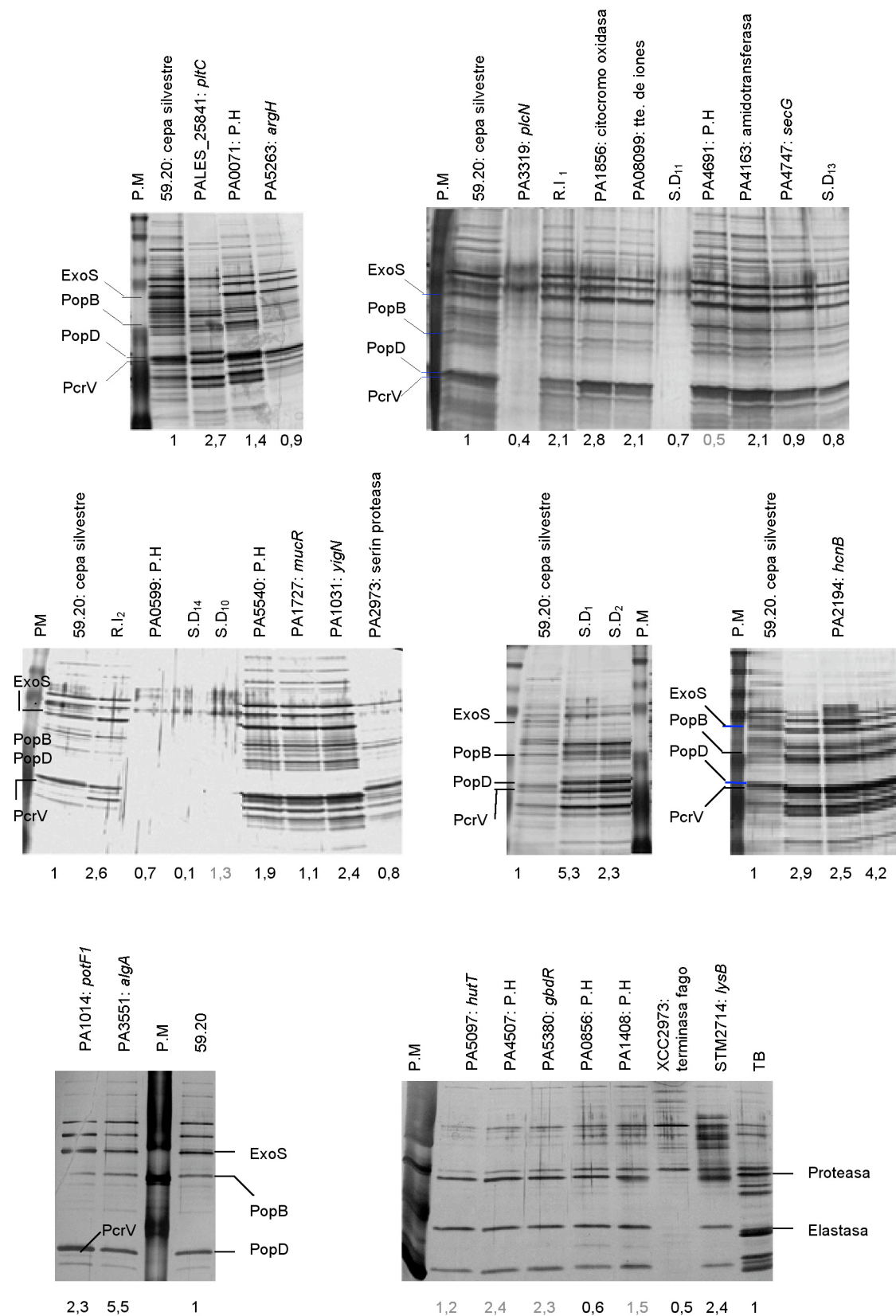
*Están marcadas aquellas proteínas que se saben que son secretadas por el T3SS

Como se observa en la Figura 11, los patrones de T3S son muy diferentes si comparamos las cuatro estirpes silvestres: 59.20 y TB son las cepas silvestres de las genotecas de mutantes objeto de nuestro estudio y PAO1 y PA14 son las estirpes silvestres de *P. aeruginosa* tomadas como referencia en la mayoría de los análisis llevados a cabo con este patógeno oportunista. La cepa 59.20 presenta los mayores niveles de producción de las proteínas ExoS, PopB y PopD. La proteína PcrV está presente tanto en la estirpe 59.20 como en PAO1.

En la Figura 12, se muestra el patrón de T3S para cada uno de los mutantes que presentaban cambios en citotoxicidad y sensibilidad a los antibióticos simultáneamente. De las identificaciones obtenidas por MALDI-TOF, sólo se determinaron en las cepas 59.20 y PAO1, proteínas que están descritas como pertenecientes al T3SS. Por este motivo, en los mutantes que pertenecen a la genoteca 59.20 se señala la localización de cuatro proteínas secretadas por este Sistema: ExoS, PopB, PopD y PcrV. Sin embargo, en los mutantes que pertenecen a la genoteca TB se señala la localización de dos proteínas identificadas por MALDI-TOF en esta cepa

(proteasa IV y elastasa A), que aunque no está descrito que sean secretadas por el T3SS, están implicadas en la virulencia de *P. aeruginosa*.





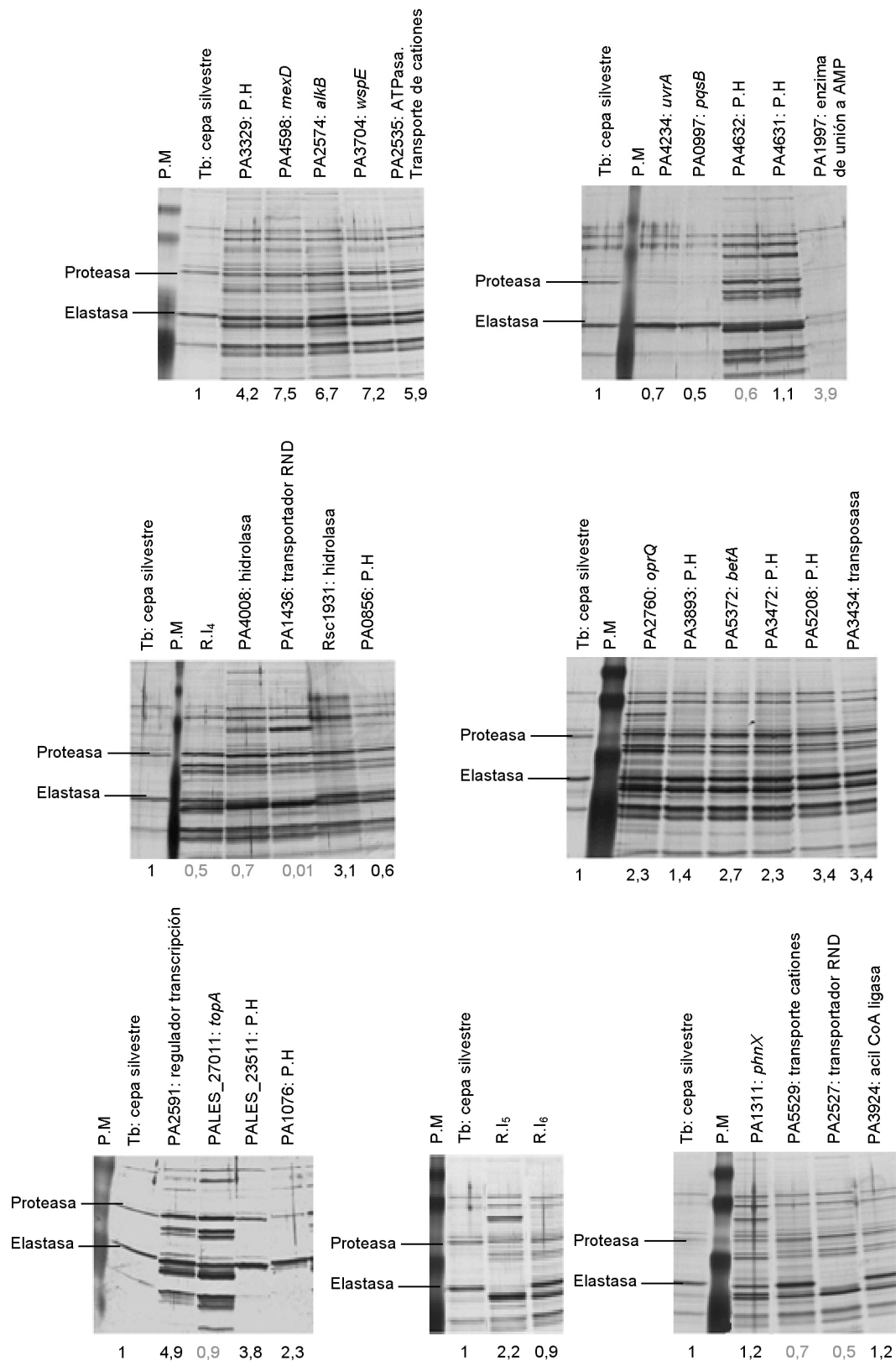


Figura 12: Comparación de citotoxicidad y de proteínas secretadas bajo condiciones de T3S de los mutantes de inserción en las cepas de *P. aeruginosa* 59.20 y TB. 59.20: estirpe silvestre de la genoteca generada por la inserción al azar del transposón *miniphoA3*. Tb: cepa silvestre de la genoteca generada por la inserción del transposón *miniTn5*. En la parte superior de cada imagen se indica el gen mutado. En la parte inferior se representan los valores de citotoxicidad, medidos en la línea celular de macrófagos de ratón J774, de cada uno de los mutantes con respecto a la estirpe silvestre. En gris se indica que el efecto en citotoxicidad es opuesto a lo que se observa en los geles de T3S. P.M.: marcador de peso molecular. S.D.: gen sin determinar. P.H.: proteína hipotética. RI: región intergénica. R.I₁: entre PA4805 (posible aminotransferasa de clase III) y PA4806 (posible regulador transcripcional). R.I₂: entre PA0599 (proteína hipotética) y PA0600 (posible sensor/regulador de dos componentes).

R.I₃: entre PA5410 (*gbcA*: metabolismo de glicina y otros aminoácidos) y PA5411 (*gbcB*: metabolismo de glicina y otros aminoácidos). R.I₄: entre PA2460 (proteína hipotética) y PA2461 (proteína hipotética). R.I₅: entre PA3450 (*lsfA*: posible proteína antioxidante) y PA3451 (proteína hipotética). R.I₆: entre PA2751 (*yfkH*: proteína hipotética de membrana) y PA2752 (*yqaA*: proteína hipotética de membrana).

En la Figura 12, se observa que existe una buena correlación (más de un 85%) entre los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad y los patrones de secreción de proteínas del T3SS. Hay algunos mutantes menos citotóxicos que poseen niveles mayores de secreción; sin embargo, son defectivos en algunas de las proteínas identificadas como esenciales en el aparato de translocación de este sistema de secreción, por lo que podría tratarse de secreción no debida al T3SS o a lisis celular. La virulencia de *P. aeruginosa* no sólo es debida a este sistema de secreción, de modo que puede haber mutantes con una menor secreción de proteínas que sean más citotóxicos con respecto a la estirpe silvestre. La citotoxicidad de este patógeno también es consecuencia de la producción de fosfolipasa C (264), ramnolípidos (206, 213), o ácido cinahídrico (40, 118, 206).

Además de la citotoxicidad, la virulencia de *P. aeruginosa* depende de otros factores, muchos de ellos regulados por QS. El estudio de estos determinantes de patogenicidad se muestra en los siguientes apartados.

4.5 Análisis de factores de virulencia regulados por el Sistema de Quórum-Sensing en mutantes con cambios simultáneos en sensibilidad a los antibióticos y virulencia

En *P. aeruginosa*, la síntesis y secreción de numerosos factores de virulencia está regulada por Quórum-Sensing (190, 316, 359, 363). El sistema de QS es clave en la patogénesis de las infecciones producidas por *P. aeruginosa* (46, 47, 55, 277, 344, 346) y controla de modo coordinado la expresión de factores de virulencia en el pulmón de pacientes de fibrosis quística (30, 382)

En los 113 mutantes que presentaban cambios simultáneos en citotoxicidad y sensibilidad a los antibióticos hemos analizado la producción de distintos factores de virulencia regulados por el sistema QS (Figura 13 y Figura 14). En particular, se midió la producción de pioverdina, piocianina, exoproteasas (elastasa y caseinasa) y la formación de *biofilms*.

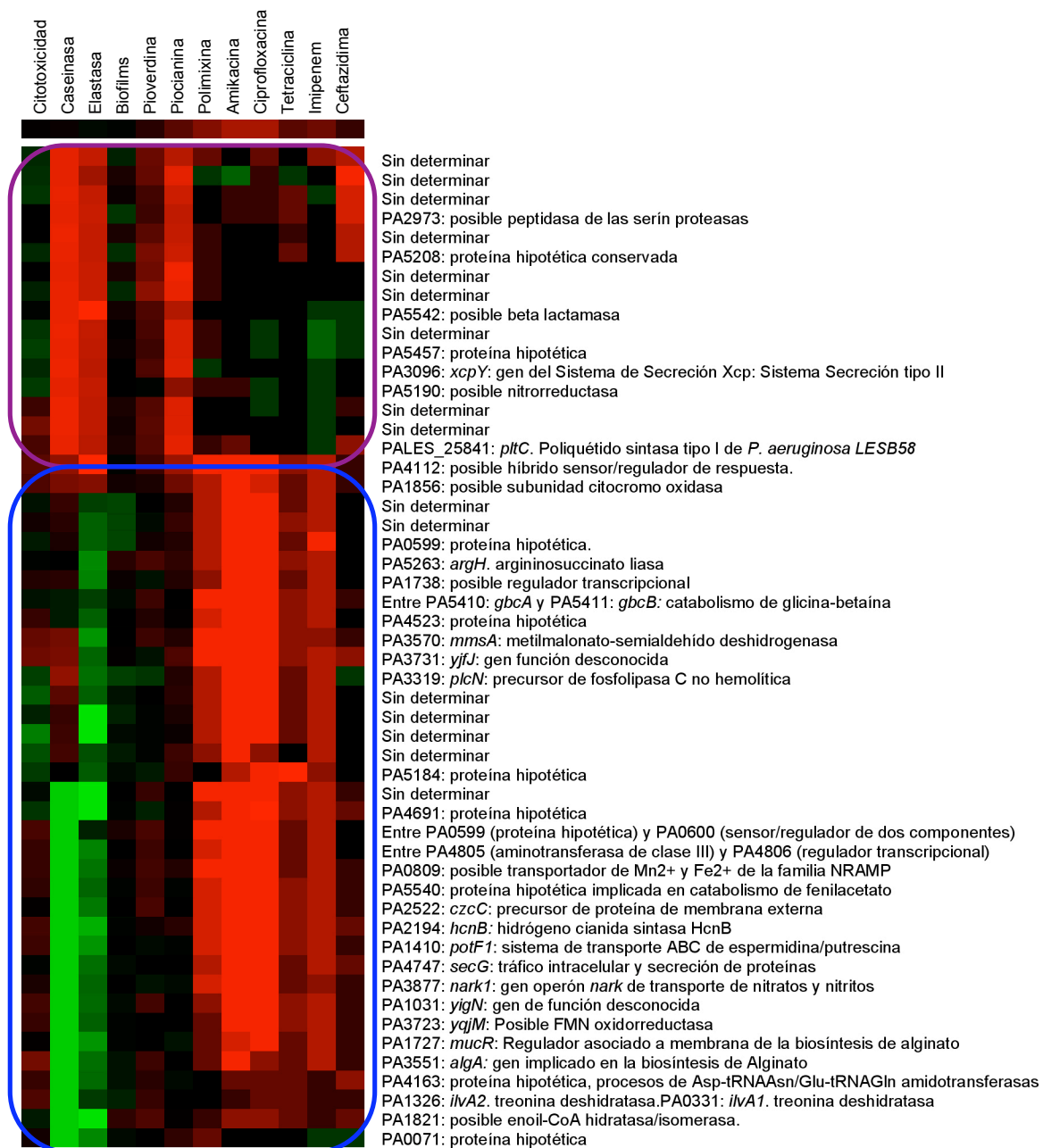


Figura 13: Análisis de factores de virulencia regulados por QS: pioverdina, piocianina, elastasa, caseinasa y *biofilms*, combinados con los datos de citotoxicidad y valores de CMI de los mutantes de la genoteca 59.20. Cada columna muestra, en código de colores los resultados de factores de virulencia regulados por QS, citotoxicidad y sensibilidad a los antibióticos de cada mutante con respecto a la estirpe silvestre. A la derecha del gráfico se nombra el gen en el que se determinó la posición del transposón. Los valores se obtienen aplicando la fórmula siguiente: $\log_2 [\text{valor mutante}/\text{valor silvestre}]$, y se agrupan utilizando los programas informáticos *Gene Cluster* y *TreeView* disponibles en: <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>. En verde, se representan valores de factores de virulencia, citotoxicidad y CMIs menores que los de la estirpe silvestre. En rojo, los mutantes con valores de determinantes de virulencia, citotoxicidad y CMIs superiores a los de su isogénica silvestre.

En la Figura 13 se muestran los resultados obtenidos al analizar el efecto que tiene la inserción del transposón en los cambios de CMIs y la expresión de factores de virulencia de la genoteca 59.20. Ya se ha mencionado anteriormente que la mayoría de los mutantes seleccionados en esta genoteca presentaban una disminución de la sensibilidad a los antibióticos

en comparación con la estirpe silvestre. Como se observa en la Figura 13, estos mutantes producen una menor cantidad de exoproteasas que la cepa silvestre. Por otro lado, los mutantes que presentan un aumento en la producción de factores de virulencia (exoproteasas, pioverdina y pioverdina) mayor variabilidad en su fenotipo de resistencia y sensibilidad a los diferentes antibióticos.

A continuación, en la Figura 14, se presentan los resultados derivados del análisis comparativo de los factores de virulencia, citotoxicidad y sensibilidad a los antibióticos de los mutantes procedentes de la genoteca TB.

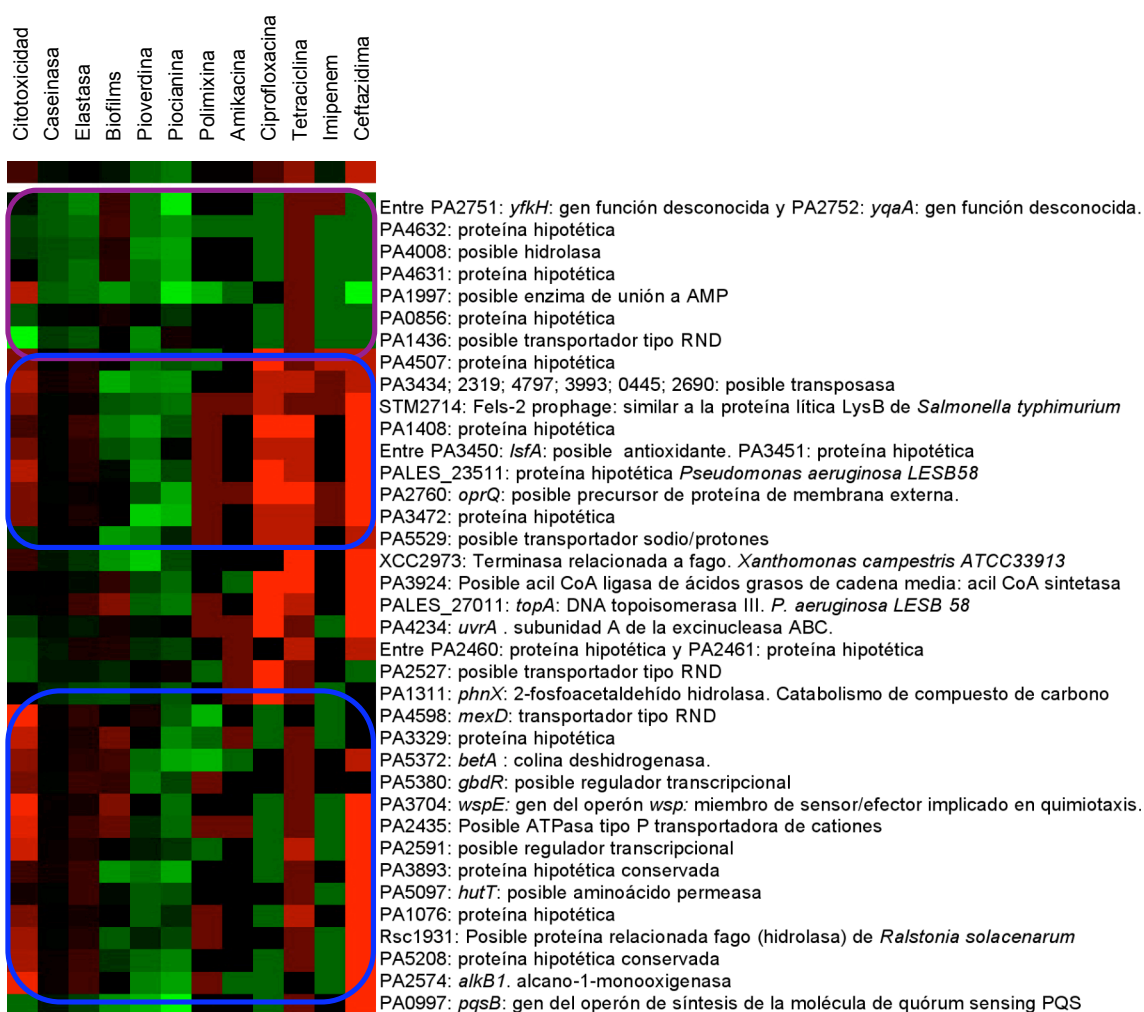


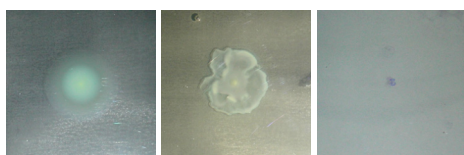
Figura 14: Análisis de factores de virulencia regulados por QS: pioverdina, piocianina, elastasa, caseinasa y *biofilms*, combinados con los datos de citotoxicidad y valores de CMI de los mutantes de la genoteca TB. Cada columna muestra, en código de colores los resultados de factores de virulencia regulados por QS, citotoxicidad y sensibilidad a los antibióticos de cada mutante con respecto a la estirpe silvestre. A la derecha del gráfico se nombra el gen en el que se determinó la posición del transposón. Los valores se obtienen aplicando la fórmula siguiente: \log_2 [valor mutante/valor silvestre], y se agrupan utilizando los programas informáticos *Gene Cluster* y *TreeView* disponibles en: <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>. En verde, se representan valores de factores de virulencia, citotoxicidad y CMIs menores que los de la estirpe silvestre. En rojo, los mutantes con valores de determinantes de virulencia, citotoxicidad y CMIs superiores a los de su isogénica silvestre.

En la Figura 14, los mutantes seleccionados de la genoteca TB con cambios simultáneos en sensibilidad y resistencia muestran una disminución de la producción de piocianina y pioverdina

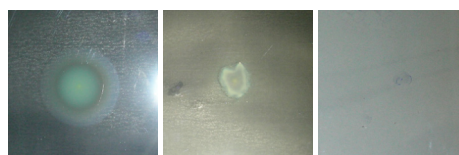
4.6 Efecto de la inserción del transposón sobre la motilidad de *P. aeruginosa*

Debido a que la motilidad es importante para la colonización del huésped por parte de *P. aeruginosa* (14), se midió la motilidad tipo *swimming*, *swarming* y *twitching* en los mutantes que tenían afectadas la sensibilidad a los antibióticos y la citotoxicidad. Los resultados obtenidos en cada una de las genotecas se observan en la Figura 15 y en la Figura 16.

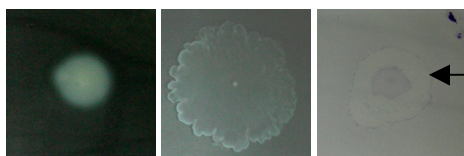




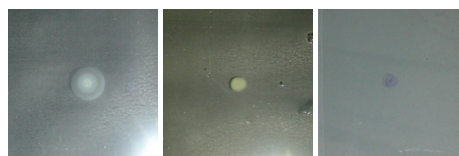
PA5457: proteína hipotética



sin determinar



PA5542: proteína hipotética con dominio beta lactamasa clase C y otras proteínas de unión a penicilinas



sin determinar



PA3731: yjJ: proteína hipotética conservada



sin determinar



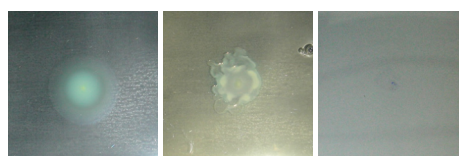
PA4523: proteína hipotética



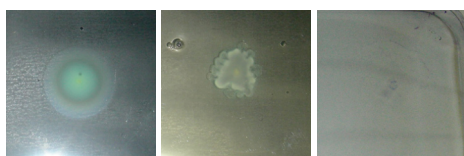
PA5184: proteína hipotética



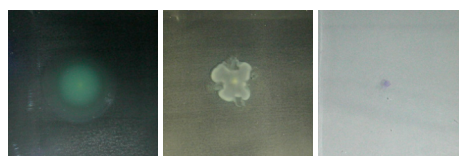
PA5208: proteína hipotética



sin determinar



sin determinar



sin determinar



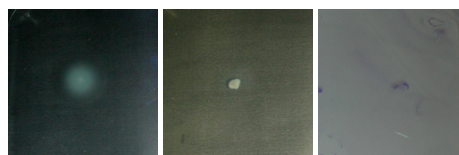
sin determinar



PA1738: posible regulador transcripcional



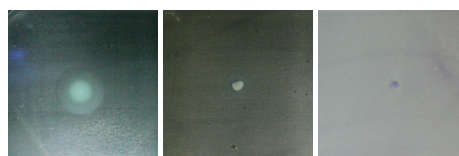
PA3877: nark1: proteína expulsión de nitritos



PA3723: yqjM: Posible FMN oxidorreductasa



PA1410: potF1: posible proteína de unión a espermidina/putrescina



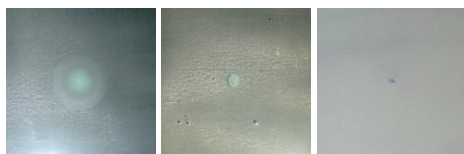
PA1856: posible subunidad de citocromo oxidasa



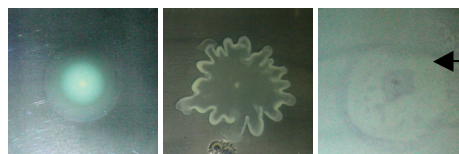
PA0809: posible transportador de iones metálicos: transportador de Mn^{2+} y Fe^{2+} de la familia NRAMP



Entre PA0599 (proteína hipotética) y PA0600 (posible regulador de dos componentes)



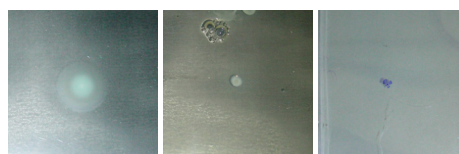
Entre PA4805 (posible aminotransferasa) y PA4806 (posible regulador transcripcional)



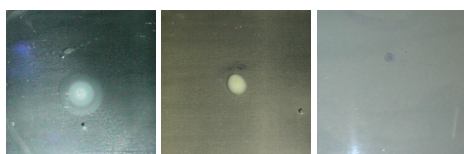
PA2973: posible serín proteasa



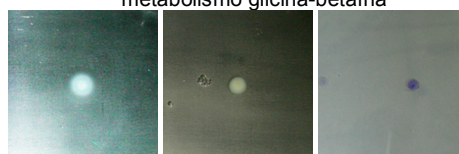
sin determinar



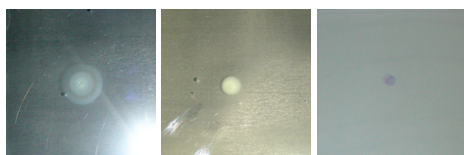
Entre PA5410 (gbcA) y PA5411 (gbcB): metabolismo glicina-betaína



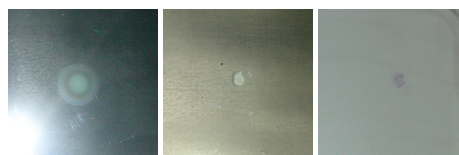
sin determinar



PA3319: plcN: precursor de fosfolipasa C no hemolítica



PA0599: proteína hipotética



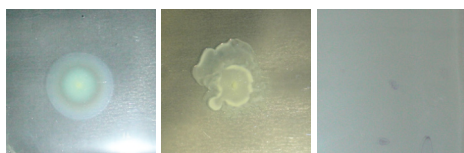
PA1326: ilvA2. treonina deshidratasa.
PA0331: ilvA1. treonina deshidratasa



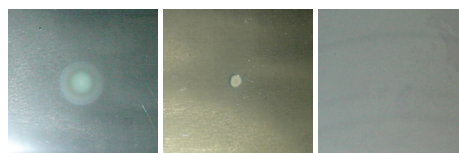
PA5263: argH. argininosuccinato liasa



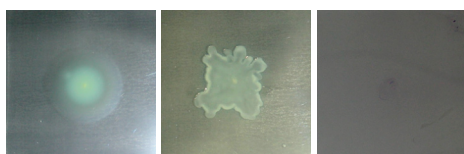
PA2522: czcC: precursor de proteína de membrana externa



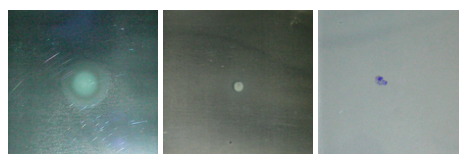
sin determinar



PA3570: mmsA: metilmalonato-semialdehído deshidrogenasa



PA4112: posible híbrido sensor/regulador



PA5540: proteína hipotética

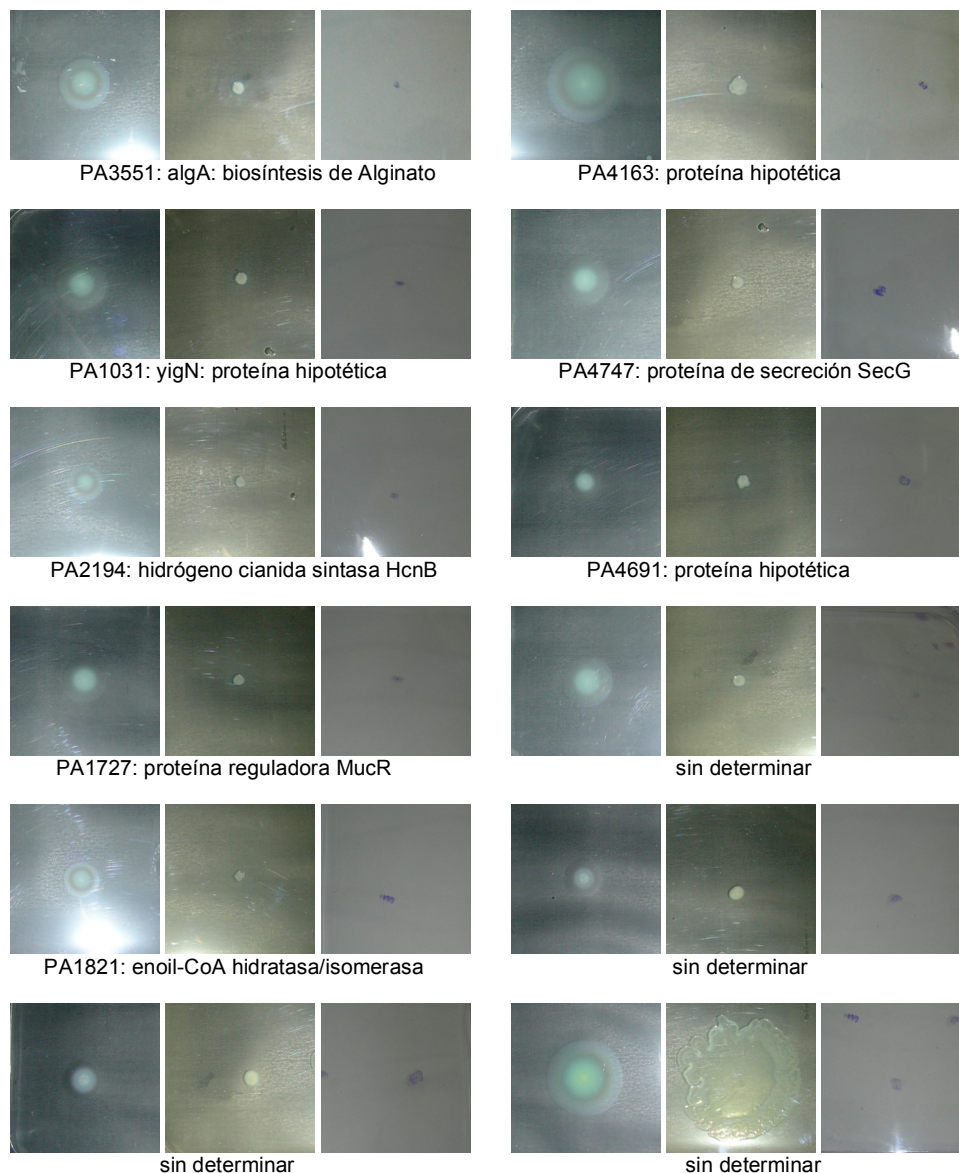


Figura 15: Análisis de la motilidad de los mutantes en la genoteca 59.20. El orden de las imágenes es para cada mutante: motilidad tipo *Swimming*, motilidad tipo *Swarming* y motilidad tipo *Twitching*. Debajo de cada grupo de fotografías correspondientes a un mutante se especifica el nombre del gen y su función tal y como se define en www.pseudomonas.com, o se define como “sin determinar”, aquellos genes que no se han logrado secuenciar. La motilidad tipo *Swimming* se mide como el radio desde el punto de inoculación hasta su halo externo de movimiento en el agar. La motilidad tipo *Twitching* se visualiza como el halo que deja el movimiento de la bacteria tras retirar el agar y teñir con cristal-violeta, tal y como se describe en Materiales y Métodos. El halo externo de los mutantes que hacen twitching está señalado mediante una flecha.

Como se puede observar en las imágenes recogidas en la Figura 15, en la genoteca 59.20, todos los mutantes tienen afectado algún tipo de motilidad. El fenotipo más frecuente es la alteración simultánea de la motilidad tipo *swimming* y la motilidad tipo *swarming* (presente en un 82% de los mutantes). Además, estos cambios se producen, generalmente, en el mismo sentido: o aumentan los dos tipos de movimiento a la vez (23%), o ambos disminuyen (65%). Este dato está de acuerdo con el hecho de que el flagelo media estos dos tipos de motilidad. Por otro lado, las mutaciones que inducen una alteración de la motilidad tipo *twitching* (presente en un 10% de los casos) son de aumento de la motilidad con respecto a la estirpe silvestre. A continuación, se muestra una tabla resumen con las alteraciones en motilidad presentes en los distintos mutantes de la genoteca 59.20.

Tabla 9: Efecto que tiene la inserción del transposón en la motilidad de los mutantes de la genoteca 59.20

<i>Swimming</i>	<i>Swarming</i>	<i>Twitching</i>	N. ID
+	+	+	Sin determinar
+	+	+	Sin determinar
+	+	=	PALES_25841: <i>pltC</i> . Poliquétido sintasa tipo I de <i>P. aeruginosa</i> LESB58
+	+	+	PA3096: <i>xcpY</i> : gen del Sistema de Secreción Xcp: Sistema Secreción tipo II
+	=	=	PA5190: posible nitrorreductasa
+	=	=	PA0071: proteína hipotética
+	+	=	PA5457: proteína hipotética
+	=	=	Sin determinar
=	+	+	PA5542: posible beta lactamasa
-	-	=	Sin determinar
-	-	=	PA3731: <i>yjfJ</i> : gen función desconocida
-	-	=	Sin determinar
-	-	=	PA4523: proteína hipotética
-	-	=	PA5184: proteína hipotética
+	+	=	PA5208: proteína hipotética conservada
+	+	=	Sin determinar
+	+	=	Sin determinar
+	+	=	Sin determinar
+	+	=	Sin determinar
+	-	=	PA1738: posible regulador transcripcional
-	-	=	PA3877: <i>nark1</i> : gen operón <i>nark</i> de transporte de nitratos y nitritos
-	-	=	PA3723: <i>yqjM</i> : Posible FMN oxidorreductasa
-	-	=	PA1410: <i>potF1</i> : sistema de transporte ABC de espermidina/putrescina
-	-	=	PA1856: posible subunidad citocromo oxidasa
-	-	=	PA0809: posible transportador de iones metálicos: transportador de Mn ²⁺ y Fe ²⁺ de la familia NRAMP
-	-	=	Entre PA0599 (proteína hipotética) y PA0600 (posible sensor/regulador de dos componentes)
-	-	=	Entre PA4805 (posible aminotransferasa de clase III) y PA4806 (regulador transcripcional)
+	+	+	PA2973: posible peptidasa de las serín proteasas
-	=	=	Sin determinar
-	-	=	Entre PA5410: <i>gbcA</i> : implicada en el catabolismo de glicina-betaína. PA5411: <i>gbcB</i> : proteína implicada en el catabolismo de glicina-betaína
-	=	=	Sin determinar
-	=	=	PA3319: <i>plcN</i> : precursor de fosfolipasa C no hemolítica
-	=	=	PA0599: proteína hipotética.
-	-	=	PA1326: <i>ilvA2</i> . treonina deshidratasa. PA0331: <i>ilvA1</i> . treonina deshidratasa
-	-	=	PA5263: <i>argH</i> . argininosuccinato liasa
-	-	=	PA2522: <i>czcC</i> : precursor de proteína de membrana externa
+	+	=	Sin determinar
-	-	=	PA3570: <i>mmsA</i> : metilmalonato-semialdehído deshidrogenasa
+	+	=	PA4112: posible híbrido sensor/regulador de respuesta.
-	-	=	PA5540: proteína hipotética implicada en catabolismo de fenilacetato
-	-	=	PA3551: <i>algA</i> : gen implicado en la biosíntesis de alginato
+	=	=	PA4163: proteína hipotética, implicada en procesos de Asp-tRNA ^{Asn} /Glu-tRNA ^{Gln} amidotransferasas
-	-	=	PA1031: <i>yigN</i> : gen de función desconocida
-	-	=	PA4747: <i>secG</i> : tráfico intracelular y secreción de proteínas
-	-	=	PA2194: <i>hcnB</i> : hidrógeno cianida sintasa HcnB
-	-	=	PA4691: proteína hipotética

-	-	=	PA1727: <i>mucR</i> : Regulador asociado a membrana de la biosíntesis de alginato
-	-	=	Sin determinar
-	-	=	PA1821: posible enoil-CoA hidratasa/isomerasa.
-	-	=	Sin determinar
-	-	=	Sin determinar
+	+	=	Sin determinar

N.ID: nombre del gen y función definida por www.pseudomonas.com.

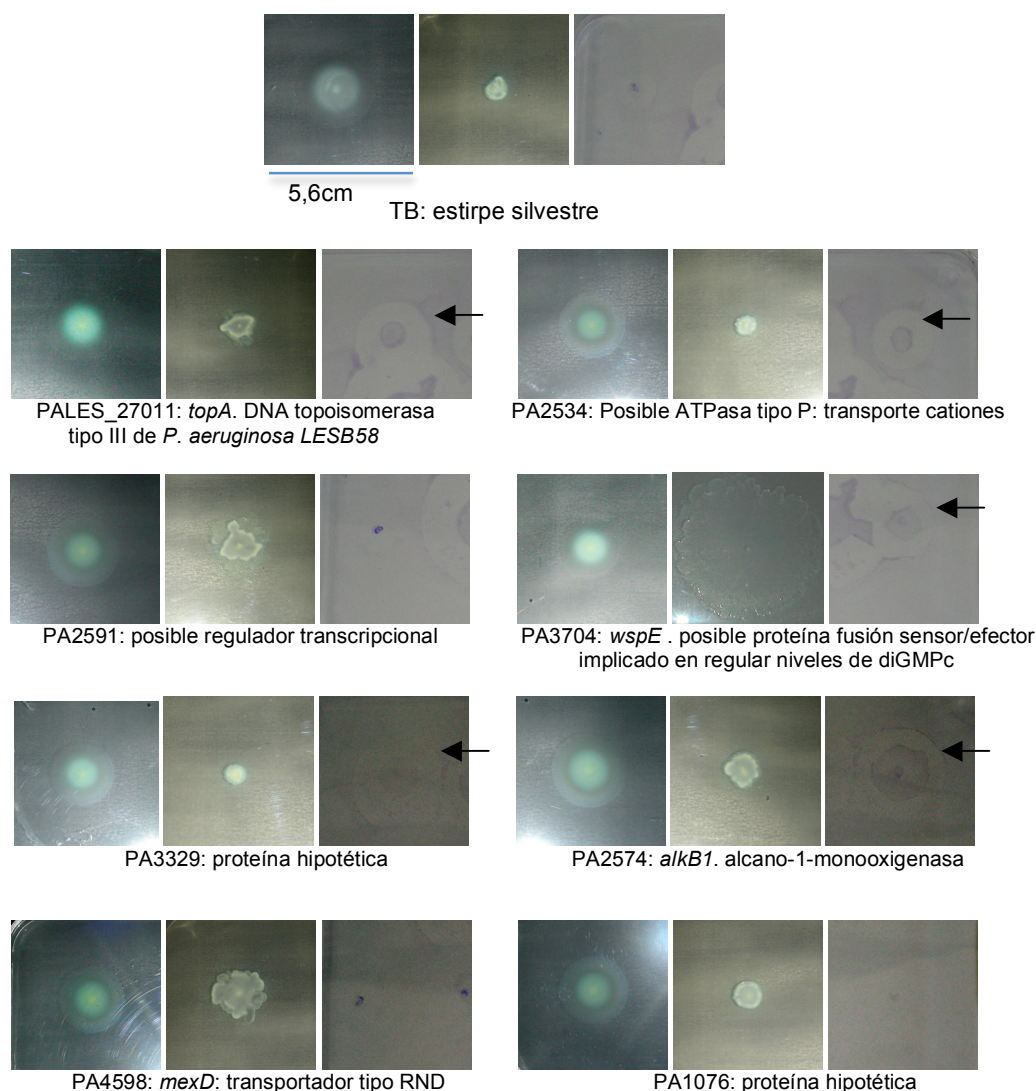
=: la motilidad del mutante es igual a la de la estirpe silvestre

+: la motilidad del mutante es mayor que la de la estirpe silvestre

-: la motilidad del mutante es inferior a la de la estirpe silvestre

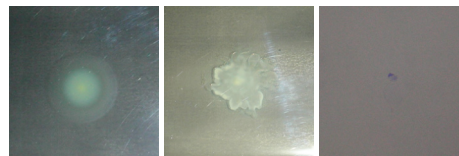
Como se muestra en la Tabla 9, más del 50% de los mutantes presentan una disminución simultánea en motilidad tipo *swimming* y *swarming*; y de ellos, sólo PA1727, que codifica MucR, está descrito como una proteína reguladora implicada en transducción de señales en procesos de motilidad y adherencia a superficies (142). El resto de genes pertenecen a categorías funcionales muy variadas.

A continuación, en la Figura 16, se muestran las imágenes de los cambios en motilidad que experimentan los mutantes de la genoteca TB con respecto a su estirpe silvestre.

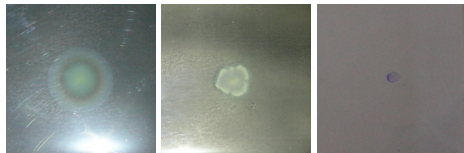




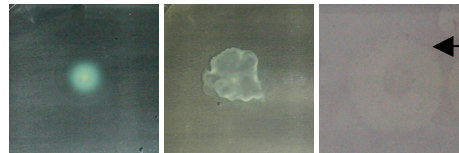
PA1436: posible transportador tipo RND



PA3434; 2319; 4797; 3993; 0445; 2690: transposasa



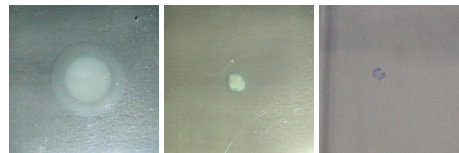
PA3893: proteína hipotética conservada



PA5208: proteína hipotética conservada



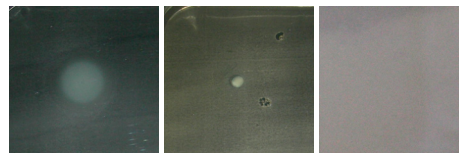
PA3472: proteína hipotética



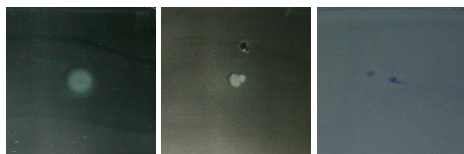
PA4631: proteína hipotética



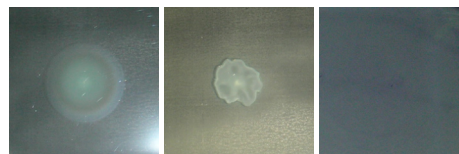
PA4632: proteína hipotética



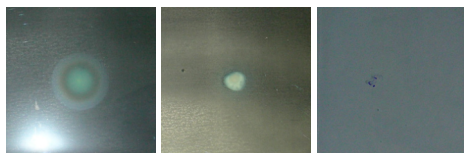
PA4008: posible hidrolasa



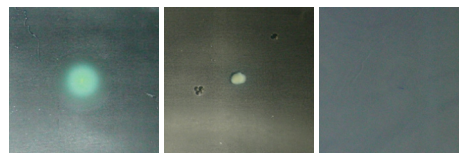
R.I. entre PA2751 (*yfkH*: proteína hipotética)
y PA2752 (*yqaA*: proteína hipotética)



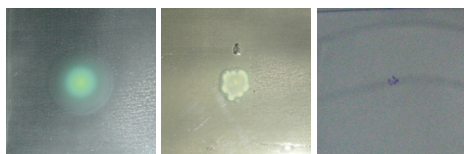
PA0997: *pqsB*: gen del operón síntesis de PQS



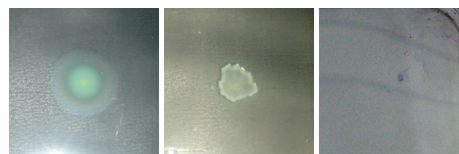
PA4234: *uvrA*: unidad A de excinucleasa ABC



PA1311: *phnX*: 2-fosfoacetaldehído hidrolasa



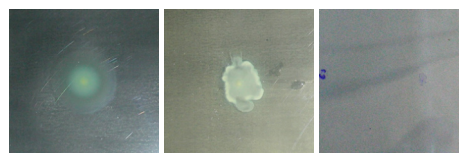
PA3924: Posible acil CoA ligasa de ácidos
grasos de cadena media: acil CoA sintetasa



PA5372: *betA*: colina deshidrogenasa



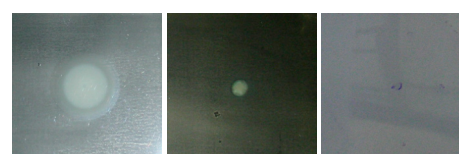
PA2760: *oprQ*: posible precursor de proteína
de membrana externa



STM2714: Fels-2 prophage: similar a la
proteína lítica lysB. *Salmonella typhimurium*



XCC2973: Terminasa relacionada a fago.
X.campestris ATCC339



PA1997: posible enzima de unión a AMP

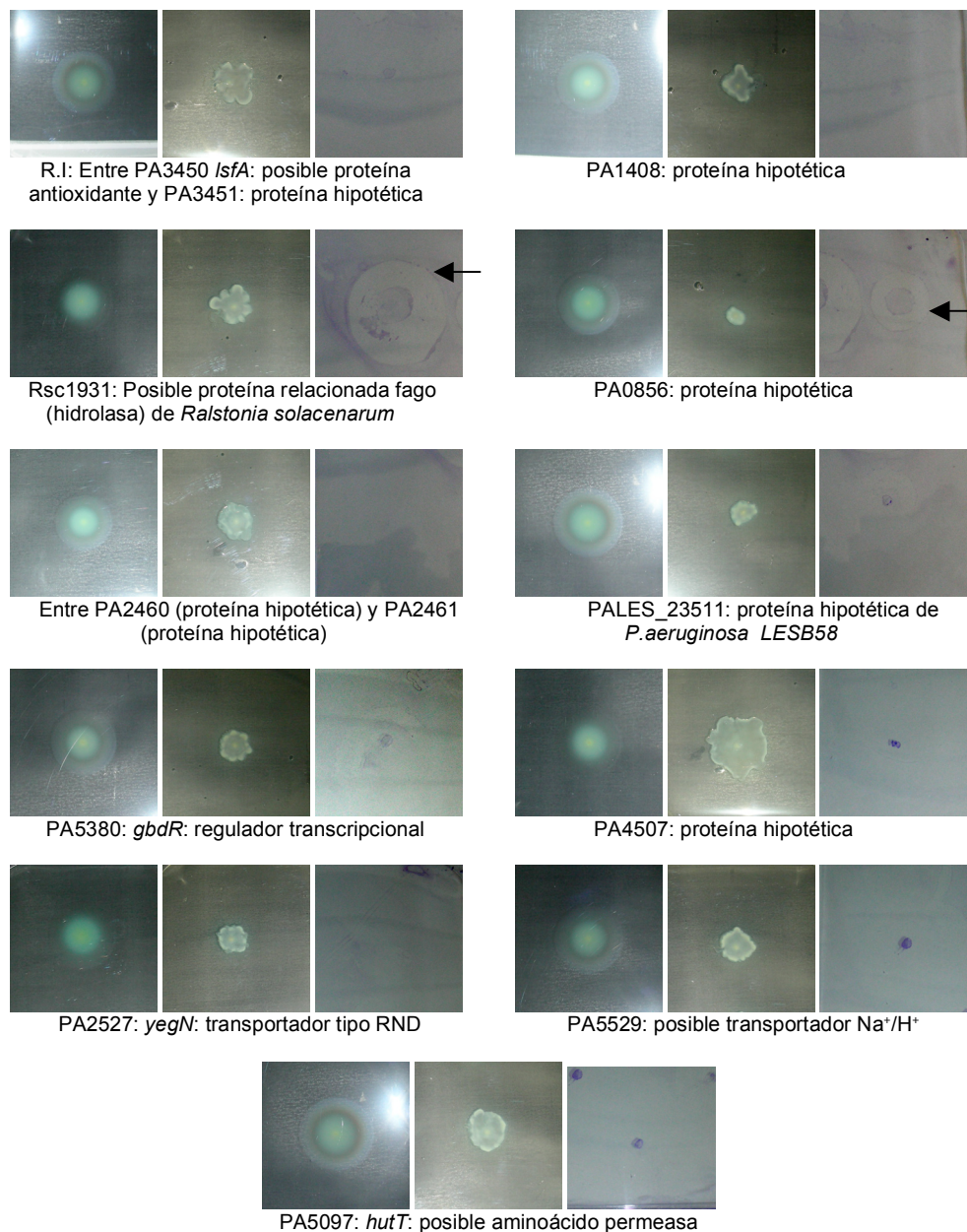


Figura 16: Análisis de la motilidad de los mutantes en la genoteca TB. El orden de las imágenes es para cada mutante: motilidad tipo *Swimming*, motilidad tipo *Swarming* y motilidad tipo *Twitching*. Debajo de cada grupo de fotografías correspondientes a un mutante se especifica el nombre del gen y su función tal y como se define en www.pseudomonas.com. La motilidad tipo *Swimming* se mide como el radio desde el punto de inoculación hasta su halo externo de movimiento en el agar. La motilidad tipo *Twitching* se visualiza como el halo que deja el movimiento de la bacteria tras retirar el agar y teñir con cristal-violeta, tal y como se describe en Materiales y Métodos. El halo externo de los mutantes que hacen twitching está señalado mediante una flecha.

Como se observa en la Figura 16 en la genoteca TB, la mayor parte de los mutantes o no presentan cambios en motilidad con respecto a la cepa silvestre o muestran variaciones en un solo tipo de movimiento. La cepa TB carece de pili tipo IV (353), por lo que presenta defectos en los tipos de motilidad que dependen de esta estructura, como son *twitching* y *swarming*. Los mutantes que tienen afectados estos dos tipos de movimiento muestran todos un aumento de motilidad.

A continuación, se muestra una tabla resumen con las alteraciones en motilidad presentes en los distintos mutantes de la genoteca TB.

Tabla 10: Efecto que tiene la inserción del transposón en la motilidad de los mutantes de la genoteca TB

<i>Swimming</i>	<i>Swarming</i>	<i>Twitching</i>	N.ID
=	=	+	PALES_27011: <i>topA</i> : DNA topoisomerasa III. <i>P. aeruginosa</i> LESB58
=	=	+	PA2435: Posible ATPasa tipo P transportadora de cationes
+	+	=	PA2591: posible regulador transcripcional
-	+	+	PA3704: <i>wspE</i> : gen del operón <i>wsp</i> : miembro de sensor/efector implicado en modulación intracelular de los niveles de di-GMPc.
=	=	+	PA3329: proteína hipotética
+	=	+	PA2574: <i>alkB1</i> . alcano-1-monooxigenasa
=	+	=	PA4598: <i>mexD</i> : transportador tipo RND
+	=	=	PA1076: proteína hipotética
=	=	=	PA1436: posible transportador tipo RND
+	+	=	PA3434; 2319; 4797; 3993; 0445; 2690: posible transposasa
=	=	=	PA3893: proteína hipotética conservada
-	+	+	PA5208: proteína hipotética conservada
=	+	+	PA3472: proteína hipotética
=	=	=	PA4631: proteína hipotética
=	=	=	PA4632: proteína hipotética
=	-	=	PA4008: posible hidrolasa
-	-	=	Entre PA2751: <i>yfkH</i> : función desconocida y PA2752: <i>yqaA</i> : función desconocida.
+	+	=	PA0997: <i>pqsB</i> : gen del operón de síntesis de la molécula de QS: PQS
-	=	=	PA4234: <i>uvrA</i> . subunidad A de la excinucleasa ABC.
-	-	=	PA1311: <i>phnX</i> : 2-fosfoacetaldehído hidrolasa. Catabolismo de compuesto de carbono
=	=	=	PA3924: Posible acil CoA ligasa de ácidos grasos de cadena media: acil CoA sintetasa
=	+	=	PA5372: <i>betA</i> : colina deshidrogenasa.
-	+	=	PA2760: <i>oprQ</i> : posible precursor de proteína de membrana externa.
=	+	=	STM2714: Fels-2 prophage: similar a proteína lítica LysB de <i>S. typhimurium</i>
=	=	+	XCC2973: Terminasa relacionada a fago. <i>Xanthomonas campestris</i> ATCC33913
=	=	=	PA1997: posible enzima de unión a AMP
=	+	=	Entre PA3450: <i>lsfA</i> : posible antioxidante. PA3451: proteína hipotética
=	=	=	PA1408: proteína hipotética
-	+	+	Rsc1931: Posible proteína relacionada fago (hidrolasa) de <i>Ralstonia solanacearum</i>
=	=	+	PA0856: proteína hipotética
-	+	=	Entre PA2460: proteína hipotética y PA2461: proteína hipotética
=	=	=	PALES_23511: proteína hipotética <i>P. aeruginosa</i> LESB58
=	=	=	PA5380: <i>gbdR</i> : posible regulador transcripcional
-	+	=	PA4507: proteína hipotética
=	=	=	PA2527: posible transportador tipo RND
=	=	=	PA5529: posible transportador sodio/protones
=	+	=	PA5097: <i>hutT</i> : posible aminoácido permeasa

N.ID: nombre del gen y función definida por www.pseudomonas.com.

=: la motilidad del mutante es igual a la de la estirpe silvestre

+: la motilidad del mutante es mayor que la de la estirpe silvestre

-: la motilidad del mutante es inferior a la de la estirpe silvestre

De los genes descritos en la Tabla 10, sólo *PA3704* está descrito que participe en procesos relacionados con la motilidad bacteriana. Este gen codifica la proteína WspE. Esta proteína forma parte de un sensor/efector implicado entre otros eventos en la formación de *biofilms* mediante la regulación de los niveles intracelulares de diGMPc (146). Además, WspE presenta un 48% de similitud con la proteína reguladora FrzE implicada en la motilidad tipo *gliding* de *Myxococcus xanthus* (228). La inserción del transposón en el gen *PA3704* provoca un aumento de la motilidad tipo *swarming* y tipo *twitching*, así como una ligera disminución en el movimiento tipo *swimming*.

Hemos enfocado la siguiente parte del trabajo a ampliar el estudio de cuatro mutantes con inserción en los siguientes genes:

A: *PA4112*: posible híbrido sensor/regulador de respuesta.

C: *PA5542*: posible beta-lactamasa

B: *PA2527*: posible miembro de una bomba MDR.

D: *PA3704 (wspE)*: miembro de un sistema sensor que regula la formación de *biofilms*.

Los mutantes con inserción en los genes *PA4112* y *PA5542* pertenecen a la genoteca 59.20. Los mutantes con inserción en los genes *PA2527* y *PA3704* provienen de la genoteca TB. Todos ellos fueron elegidos porque pertenecen a categorías funcionales muy diferentes y podrían estar involucrados en los fenómenos de virulencia/resistencia a distintos niveles: *PA4112* es un gen del que no se prevé que debiera estar directamente involucrado en resistencia y que está implicado en comunicación y regulación bacteriana, *PA2527* es un gen que podría estar implicado en resistencia y en QS (comunicación bacteriana), *PA5542* se enmarcaría dentro de los genes clásicos de resistencia y podrá estar implicado en la síntesis de peptidoglicano y *PA3704* es un gen implicado en formación de *biofilms* y por tanto, indirectamente, en resistencia, motilidad, comunicación y regulación bacteriana.

4.7 Análisis de un posible sistema regulador de dos componentes implicado simultáneamente en resistencia y virulencia en *P. aeruginosa*

Con todos los datos obtenidos hasta el momento, el siguiente paso fue centrarnos en alguno de los mutantes, que por sus características fenotípicas y por la posición en la que se había insertado el transposón resultaban más interesantes. Uno de estos mutantes pertenece a la genoteca obtenida a partir de la cepa de *P. aeruginosa* 59.20. Este mutante presenta una inserción en el gen *PA4112* (a este mutante lo denominamos AF04). El gen *PA4112* codifica una proteína a la que se le asigna una posible función como híbrido sensor/regulador de respuesta, en base a la presencia de motivos conservados y características estructurales. La inserción se encuentra en la parte sensora de esta proteína. Este gen presenta un 52% de similitud con una histidina quinasa transductora de señal de *Synechocystis sp* (168).

Para tener una demostración del fenotipo de virulencia y de sensibilidad a los antibióticos obtenido para el mutante de inserción en el gen *PA4112*, se hicieron dos abordajes experimentales complementarios. Por una parte, se obtuvo un mutante por delección del gen *PA4112* y por otra, se clonó dicho gen en el plásmido pMMB67HE-42 previamente linearizado con la enzima NotI. En todos los mutantes de inserción, la complementación se hizo tal y como se detalla en Materiales y Métodos (Apartado 3.4.3), subclonando los genes mediante *Gateway Technology* de Invitrogen. Una vez obtenidas estas cepas, se analizaron sus características fenotípicas.

Tal y como se describe en Materiales y Métodos (Apartado 3.4.2), en una de las etapas de la construcción del mutante de delección, los transconjugantes se seleccionan en presencia de estreptomycin. La cepa silvestre 59.20 es muy resistente a dicho antibiótico. Esto nos planteó un problema a la hora de obtener el mutante de delección en esta cepa de *P. aeruginosa*, por lo que decidimos construirlo en la estirpe silvestre PAO1 de *P. aeruginosa*.

Para construir el mutante de delección se utilizó el vector suicida pKNG101 (169). Se amplificaron mediante PCR los dos fragmentos que flanquean en el cromosoma bacteriano al gen *PA4112* (fragmentos "A": 559pb y "B": 415pb). Para ello se utilizaron los oligonucleótidos denominados OAA1, OAA2 para amplificar el fragmento "A", OAA3 y OAA4 para amplificar el fragmento "B" (ver Materiales y Métodos) y se clonó en pKNG101 el fragmento de 974pb (fragmento "AB") resultante de la amplificación conjunta de los dos fragmentos. El gen fue eliminado del cromosoma de *P. aeruginosa* PAO1 mediante recombinación homóloga en dos pasos (Figura 17), tal y como se describe en Materiales y Métodos.

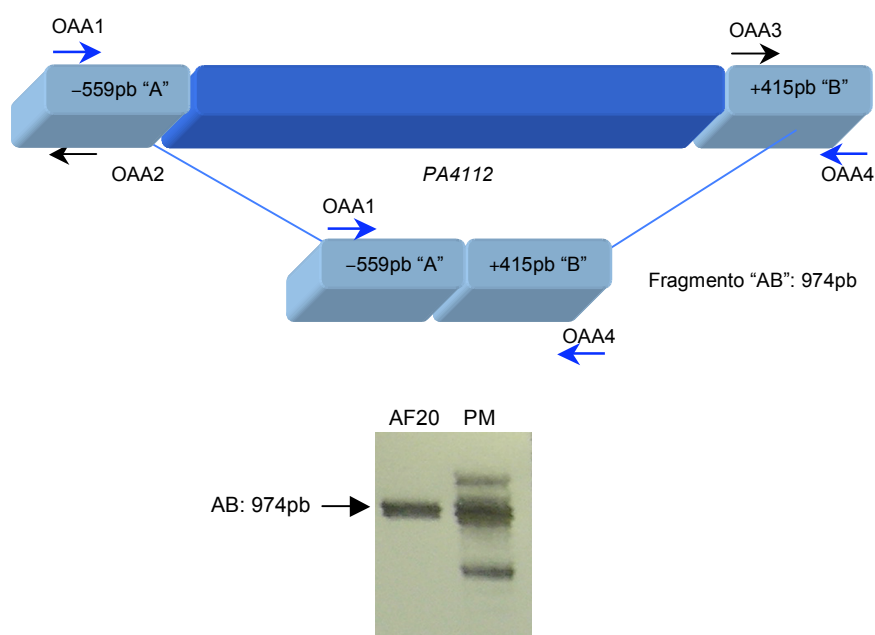


Figura 17: Esquema de la delección del gen *PA4112* del cromosoma de PAO1. En el gel de agarosa se muestra señalado con una flecha la comprobación por PCR de la delección del gen *PA4112* del cromosoma de PAO1. PM: peso molecular. AF20: mutante de delección en el gen *PA4112* en PAO1.

A continuación se muestran los resultados detallados de los análisis realizados con el mutante de inserción en el gen *PA4112*, el mismo mutante complementado con el gen silvestre y el mutante de delección en dicho gen. Para nombrar los distintos mutantes utilizaremos a partir de ahora, las letras I (mutante de inserción), C (mutante complementado) y Δ (mutante de delección) junto a su nombre asignado (tal y como se detalla en la Tabla 1 de descripción de cepas en el apartado 2.1 de Materiales y Métodos).

En primer lugar, analizamos los cambios en la sensibilidad a los antibióticos de los mutantes comparados con sus estirpes silvestres correspondientes (Tabla 11).

Tabla 11: Concentraciones mínimas inhibitorias ($\mu\text{g/ml}$) de mutantes en el gen *PA4112*.

Cepa	Polimixina	Amikacina	Ciprofloxacino	Tetraciclina	Imipenem	Ceftazidima
59.20	2	2	0,0625	8-16	16-32	2
AF04 (I)	4	4	1	32	32-64	4
AF06 (C)	1	0,5	0,25	32	4	8
PAO1	2	1	0,06	16	2	0,5
AF20 (Δ)	2	1	0,06	16	4	0,5

59.20 (silvestre). AF04 (mutante de inserción). AF06 (mutante complementado). PAO1 (estirpe silvestre del mutante de delección). AF20 (mutante de delección del gen *PA4112* en PAO1). (I): inserción, (C): complementado, (Δ): delección.

Como puede observarse en la Tabla 11, el mutante de inserción AF04 presentaba una menor sensibilidad a diversos antibióticos que la estirpe silvestre 59.20. Los mayores niveles de resistencia del mutante de inserción son en presencia de ciprofloxacina donde su CMI asciende a $1\mu\text{g/ml}$ (cuatro veces mayor que la cepa silvestre). En el resto de antibióticos el mutante de inserción en el gen *PA4112* presenta unos valores de CMI dos veces superiores a 59.20.

Cuando se expresa el gen *PA4112* desde un promotor heterólogo en el mutante AF06, se recuperan los niveles de sensibilidad a polimixina, amikacina, ciprofloxacino e imipenem. Por otro lado, la sobreexpresión de *PA4112* aumenta la CMI del mutante complementado a ceftazidima. Esto indica que la expresión de *PA4112* complementa, al menos parcialmente, la mutación producida por la inserción del transposón. Sin embargo, la delección del gen *PA4112* en la cepa PAO1 sólo cambia la sensibilidad a imipenem. Este resultado sugiere, bien que la actividad de *PA4112* es dependiente de la cepa de *P. aeruginosa* con la que trabajemos, bien que la inserción permite la síntesis de una forma truncada de *PA4112* que tiene una actividad distinta a la de la proteína completa.

A continuación se hizo un estudio de la citotoxicidad de los mutantes en la línea de macrófagos de ratón J774 y un análisis de los factores de virulencia regulados por QS. En la Tabla 12 se detallan los valores de citotoxicidad, piocianina, pioverdina, actividad de proteasas (caseinasa y elastasa) y formación de *biofilms* del mutante de inserción, de dicho mutante complementado y del mutante de delección en *PA4112* comparados todos ellos con sus cepas silvestres correspondientes.

Tabla 12: Factores de virulencia: Resultados de los análisis de la producción de distintos factores de virulencia para los mutantes en el gen *PA4112*.

Factores de virulencia	AF04 (I)	AF06 (C)	AF20 (Δ)
Citotoxicidad	1,64	0,44	0,41
Elastasa	150,60	96,80	1,65
Caseinasa	75,71	91,14	1,49
Piocianina	14,55	4,60	0,74
Pioverdina	4,10	2,32	1,70
Biofilms	0,87	0,78	0,99

59.20 (silvestre). AF04 (mutante de inserción). AF06 (mutante complementado). PAO1 (estirpe silvestre del mutante de delección). AF20 (mutante de delección del gen *PA4112* en PAO1). (I): inserción, (C): complementado, (Δ): delección. Los resultados están expresados como la razón entre el valor del mutante de inserción y el valor de la cepa silvestre correspondiente.

Como se muestra en la Tabla 12, el mutante de inserción AF04 es más citotóxico que la estirpe silvestre 59.20 en los ensayos de infección en la línea de macrófagos J774. Además, se observa un aumento importante de la producción de factores de virulencia del mutante de

inserción AF04 con respecto a la estirpe silvestre 59.20, excepto en la formación de *biofilms*, donde no se aprecian diferencias significativas.

Como se refleja en la Tabla 12, la cepa complementada AF06 presenta una menor producción de elastasa, piocianina y pioverdina que el mutante de inserción AF04 pero no recupera totalmente los valores de la estirpe silvestre 59.20. La sobreexpresión del gen *PA4112* produce una disminución drástica de la citotoxicidad medida en la línea de macrófagos J774. En este caso, como sucede con los análisis de sensibilidad a los antibióticos, la expresión de *PA4112* en el mutante de inserción complementa parcialmente la mutación en dicho gen.

El mutante de delección en el gen *PA4112* en la cepa PAO1 mantiene un fenotipo similar al mutante de inserción en la producción de elastasa, caseinasa y pioverdina pero las diferencias no son tan acusadas con respecto a su isogénica silvestre como sucede en el caso del mutante de inserción.

Como puede apreciarse en la Figura 18, la mayor citotoxicidad que presenta el mutante de inserción AF04 comparado con su estirpe silvestre, se correlaciona con un incremento en el mutante en la secreción de proteínas del T3SS. Cuando se analizó el patrón de T3S se observó que se expresan a un mayor nivel en el mutante tanto proteínas efectoras secretadas por este sistema (ExoS) como proteínas que forman parte del sistema de translocación (PopB, PopD y PcrV). De acuerdo con los valores de citotoxicidad expresados en la Tabla 12, tanto el mutante de complementación AF06 como el mutante AF20 tienen una menor producción de T3S. El mutante de complementación recupera el fenotipo de la cepa silvestre 59.20. Sin embargo, el mutante de inserción AF04 y el de delección AF20 no tienen un fenotipo similar en el patrón de expresión del sistema T3SS.

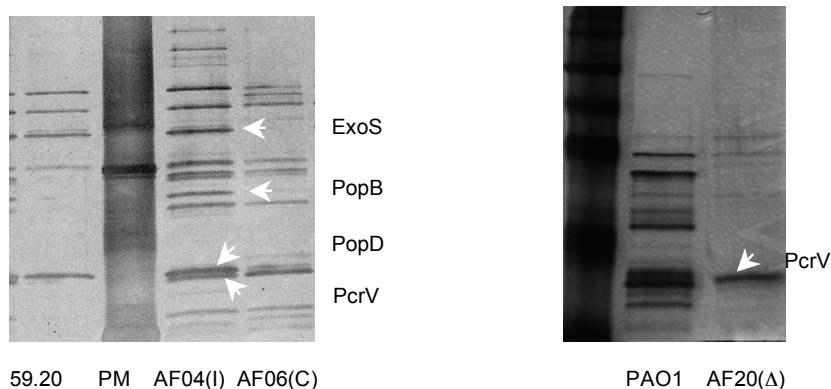


Figura 18:. Patrón de secreción del T3SS de los mutantes en el gen *PA4112*. Mutante de inserción AF04, mutante complementado AF06 y mutante de delección AF20. 59.20: cepa silvestre para mutante de inserción y complementado. PAO1: cepa silvestre para mutante de delección. En el gel están señaladas cuatro proteínas que forman parte de este sistema: ExoS (proteína efectora), PopB, PopD y PcrV que forman parte del sistema de translocación del T3SS.

Como se ha descrito con anterioridad, en *P. aeruginosa*, su capacidad para formar *biofilms* y adherirse a las distintas superficies es de extrema importancia para la motilidad. A continuación, en la Figura 19, comparamos la capacidad migratoria de los mutantes con respecto a sus cepas silvestres, comprobando que existen alteraciones claras en motilidad.

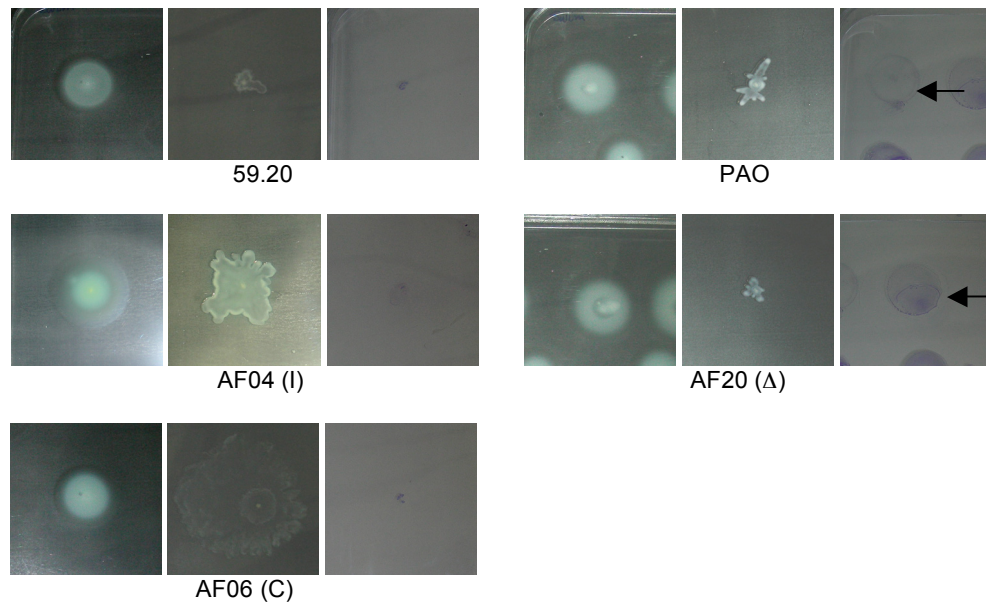


Figura 19: Ensayos de motilidad en los mutantes para el gen *PA4112*. Comparación de la motilidad de tipo *swimming* (a), *swarming* (b) y *twitching* (c). 59.20: cepa silvestre para mutante de inserción y mutante complementado. AF04: mutante de inserción en el gen *PA4112*. AF06: mutante de inserción complementado con el gen *PA4112*. PAO1: cepa silvestre para mutante de delección. AF20: mutante de delección en el gen *PA4112* en *P. aeruginosa* PAO1. (I): inserción, (C): complementado, (Δ): delección. Con una flecha se señala el halo de movimiento tipo *twitching*

Como se observa en la Figura 19 la inserción del transposón en el gen *PA4112* afecta positivamente a la motilidad tipo *swimming* y *swarming* de *P. aeruginosa*, mientras que no parece influir en la motilidad tipo *twitching*.

Por otro lado, la sobreexpresión de *PA4112* en el mutante complementado AF06 hace que se recupere el fenotipo de la estirpe silvestre en la motilidad tipo *swimming*. Sin embargo, el mutante complementado AF06 presenta una mayor capacidad de motilidad tipo *swarming* que el mutante de inserción AF04 y su cepa silvestre 59.20.

Al deleccionar el gen no observamos cambios significativos entre la estirpe silvestre PAO1 y el mutante de delección AF20.

La expresión de la proteína PA4112 complementa, sólo parcialmente, los fenotipos descritos de sensibilidad a los antibióticos y virulencia del mutante de inserción para dicho gen. Las diferencias observadas entre el mutante de delección y el mutante de inserción pueden ser debidas a dos posibles causas: 1) Los mutantes se obtuvieron en dos cepas silvestres de *P. aeruginosa* diferentes (59.20 para el mutante de inserción y PAO1 para el mutante de delección) y el efecto de la mutación puede ser distinto en cada una de ellas. 2) El transposón está insertado en la parte sensora del doble híbrido sensor/regulador, lo que podría provocar la síntesis de una proteína truncada que tuviera una actividad distinta a la de la proteína completa.

Está descrito que el gen *PA4112* codifica un posible sensor/regulador híbrido y debido al fenotipo que presentan los mutantes de inserción, complementado y de delección, la proteína PA4112 parece estar implicada de un modo global en la virulencia y la resistencia a los antibióticos de *P. aeruginosa* y su función podría ser modular la respuesta de la bacteria (resistencia y virulencia) a señales que aún desconocemos.

4.8 Análisis de una nueva betalactamasa de *P. aeruginosa* implicada en la virulencia de esta bacteria.

Otro de los mutantes analizados más en profundidad pertenece también a la genoteca obtenida a partir de la cepa silvestre 59.20. Se trata del mutante denominado AF07. Al analizar la región del genoma en la que se había insertado el transposón vimos que se trataba del gen *PA5542*. Este gen codifica una proteína hipotética que contiene un dominio β -lactamasa de clase C y de otras proteínas de unión a penicilinas. *P. aeruginosa*, como muchos otros microorganismos, produce una cefalosporinasa de clase C codificada en el cromosoma y que se denomina AmpC. La hiperproducción de AmpC es uno de los mecanismos de resistencia más prevalentes documentado entre cepas clínicas de *P. aeruginosa* (247). Las β -lactamasas de clase C son, por tanto, genes clásicos de resistencia a los antibióticos, por lo que decidimos ampliar el estudio de este mutante y determinar la actividad de esta proteína.

Para tener una demostración del fenotipo de virulencia y de sensibilidad a los antibióticos obtenido para el mutante de inserción en el gen *PA5542*, se hicieron dos abordajes experimentales complementarios. Por una parte, se obtuvo un mutante por delección del gen *PA5542* y por otra, se clonó dicho gen en distintos plásmidos: pET28a(+), pUCP24 y pMMB67-HE. Una vez obtenidas estas cepas, se analizaron sus características fenotípicas. Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, debido a los problemas para obtener el mutante de delección en la cepa silvestre 59.20, decidimos construir el mutante en otras estirpes silvestres de *P. aeruginosa*. En este caso, el mutante en el gen *PA5542* se obtuvo en la cepa de *P. aeruginosa* PA14.

Para construir el mutante de delección se utilizó el vector suicida pKNG101 (169). Se amplificaron mediante PCR los dos fragmentos que flanquean en el cromosoma bacteriano al gen *PA5542* (fragmentos "C": 418pb y "D": 444pb). Para ello se utilizaron los oligonucleótidos denominados OAA9, OAA10 para amplificar el fragmento "C", OAA11 y OAA12 para amplificar el fragmento "D" (ver Materiales y Métodos). Se clonó en pKNG101 el fragmento de 862pb (fragmento "CD") resultante de la amplificación conjunta de los dos fragmentos. El gen fue eliminado del cromosoma de *P. aeruginosa* PA14 mediante recombinación homóloga en dos pasos (Figura 20).

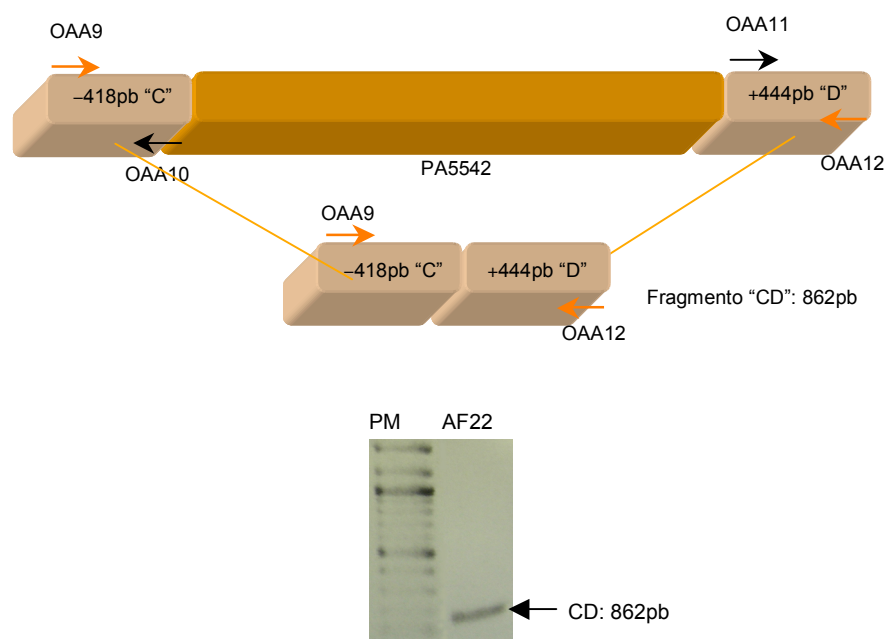


Figura 20: Esquema de la delección del gen *PA5542* del cromosoma de PA14. En el gel de agarosa se muestra con una flecha la comprobación por PCR de la delección del gen *PA5542* del cromosoma de PA14. PM: peso molecular. AF22: mutante de delección en el gen *PA5542* en PAO1.

Como se observa en la Tabla 13, el mutante de inserción en el gen *PA5542* (AF07) presentaba una sensibilidad mayor al grupo de antibióticos de la familia de los β -lactámicos: cuatro veces superior a imipenem y dos veces superior a ceftazidima comparado con su cepa silvestre 59.20.

Tabla 13: Concentraciones mínimas inhibitorias ($\mu\text{g/ml}$) en el mutante de inserción en el gen *PA5542*.

Cepa	Polimixina	Amicacina	Ciprofloxacino	Tetraciclina	Imipenem	Ceftazidima
59.20	2	2	0,06	8-16	16-32	2
AF07	2	2	0,06	8-16	4-8	1

59.20 (silvestre). AF07 (mutante de inserción).

Este resultado está de acuerdo con la predicción bioinformática, según la cual, el gen *PA5542* codifica una β -lactamasa de clase C. Para determinar si esta predicción era cierta, clonamos el gen *PA5542* en el vector pET28a(+) y en el vector pUCP24, y expresamos la proteína tanto en *E. coli* como en *P. aeruginosa*.

Para comprobar la funcionalidad del gen clonado en el vector pET28a(+) en la cepa de expresión de *E. coli* BL21 (DE3)pLysS, se determinaron las CMI de distintos β -lactámicos para las bacterias transformadas con el vector recombinante (AF29), comparándose con las obtenidas para la cepa transformada con el vector que no expresa la proteína *PA5542* (AF28), así como con el mutante de inserción en *PA5542* en 59.20 (AF07) y el mutante de delección del gen *PA5542* en PA14 (AF22) (Tabla 14).

Tabla 14: Concentraciones mínimas inhibitorias frente a β -lactámicos ($\mu\text{g/ml}$) para las cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* que expresan el gen *PA5542* desde un promotor heterólogo.

Antibióticos	CMI ($\mu\text{g/ml}$)					
	AF28	AF29	59.20	AF07 (I)	PA14	AF22 (Δ)
Piperacilina	0,25	0,25	8	4	4	2
Amoxicilina/Clavulánico	64	64	1024	1024	512	1024
Cefazolina	1	1	4096	4096	4096	4096
Cefuroxima	0,5	1	2048	1024	512	1024
Cefoxitina	1	2	4096	2048	1024	2048
Cefotaxima	0,0039	0,0039	16	32	8	16
Ceftazidima	0,015	0,015	1	0,5	0,5	0,5
Cefepima	0,0078	0,0078	4	1	2	1
Aztreonam	0,015	0,25	8	4	16	8
Imipenem	0,125	0,25	32	2	4	1

AF28: cepa silvestre de *E. coli* BL21 (DE3)pLysS transformada con el vector control. AF29: cepa silvestre de *E. coli* BL21 (DE3)pLysS transformada con el vector que expresa la proteína *PA5542*. 59.20 (silvestre). AF07 (mutante de inserción). PA14 (estirpe silvestre del mutante de delección). AF22 (mutante de delección del gen *PA5542* en PA14). (I): inserción, (Δ): delección.

Como se observa en la Tabla 14, en el caso de 2 antibióticos sustratos de β -lactamasas (aztreonam e imipenem), la bacteria que contenía el vector recombinante (AF29) resultó ser menos sensible que la bacteria que contenía el vector sin inserto (AF28). Además, para estos dos antibióticos, el mutante de inserción (AF07) y de delección (AF22) en PA5542 eran más sensibles comparados con sus cepas silvestres, 59.20 y PA14, respectivamente.

Estos datos indican que la proteína codificada por el gen PA5542 tiene una actividad específica frente a β -lactámicos del grupo de los carbapenemas (imipenem y meropenem) y monobactámicos (aztreonam). Para comprobar esta hipótesis se clonó el gen PA5542 en el vector pUCP24 y se transformaron tanto la cepa de *E. coli* MI1443 (que carece de la β -lactamasa cromosómica) como la cepa silvestre de *P. aeruginosa* 59.20 y se determinó su sensibilidad a imipenem, meropenem y aztreonam. Los resultados se resumen en la Tabla 15.

Tabla 15: Concentraciones mínimas inhibitorias frente a carbapenemas y aztreonam ($\mu\text{g/ml}$) para las cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* que expresan el gen PA5542 desde un promotor heterólogo.

Antibiótico	CMI ($\mu\text{g/ml}$)			
	AF24	AF25	AF26	AF27
Meropenem	1,5	2	0,006	0,023
Imipenem	12	32	0,094	0,25
Aztreonam	0,5	0,75	0,047	0,094

AF24: cepa silvestre 59.20 que contiene el plásmido pUCP24 sin inserto. AF25: cepa 59.20 que contiene el plásmido recombinante pAFL019 (vector pUCP24 que contiene el gen PA5542). AF26: cepa silvestre MI1443 que contiene el plásmido pUCP24 sin inserto. AF27: cepa MI1443 que contiene el plásmido recombinante pAFL019 (pUCP24 que contiene el gen PA5542).

Como se observa en la Tabla 15, la bacteria que contenía el vector recombinante tanto en *P. aeruginosa* (AF25) como en *E. coli* (AF27) era menos sensible a imipenem, meropenem y aztreonam que la bacteria que portaba el vector sin inserto (AF24 y AF26, respectivamente). Con el fin de detectar la presencia de actividad betalactamasa y frente a carbapenemas, llevamos a cabo distintos ensayos espectrofotométricos, tal y como se describe en Materiales y Métodos (Apartados 3.6.2.4 y 3.6.2.5).

4.8.1 Medida de actividad β -lactamasa

Para determinar la actividad β -lactamasa de PA5542, clonamos el gen PA5542 en el vector pET28a(+), obteniendo el plásmido pNMM1, y expresamos la proteína en *E. coli*. A fin de detectar la presencia de actividad β -lactamasa, llevamos a cabo un ensayo espectrofotométrico usando nitrocefina como sustrato según lo descrito en Materiales y Métodos. El análisis de la curva obtenida muestra la existencia de actividad β -lactamasa, no presente en el extracto sonificado procedente del cultivo transformado con el vector sin inserto (Figura 21).

La actividad enzimática obtenida fue de 0,115 nmoles de nitrocefina hidrolizada por minuto y por mg de proteína presente en el extracto en el caso del cultivo de bacterias transformadas con el vector que lleva inserto el gen PA5542: pNMM1 (curva malva). La actividad obtenida en el extracto de células transformadas con el vector sin inserto (curva verde) fue de 0,001 nmoles/min·mg de proteína.

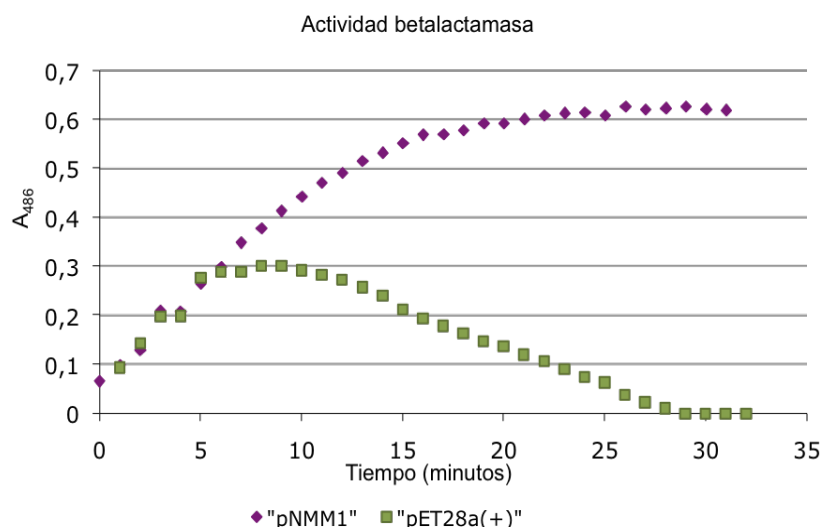


Figura 21: Análisis cuantitativo de la actividad β -lactamasa. pNMM1: vector pET28a(+) que lleva inserto el gen *PA5542*. pET28a(+): vector sin inserto

Para confirmar los resultados obtenidos hasta el momento, en los que se observaba una menor sensibilidad a carbapenemas de las bacterias que tenían sobreexpresado el gen *PA5542*, llevamos a cabo ensayos espectrofotométricos de degradación de imipenem con extractos proteicos de bacterias que expresaban la β -lactamasa y los comparamos con extractos obtenidos a partir de bacterias que no expresaban dicha proteína (Figura 22).

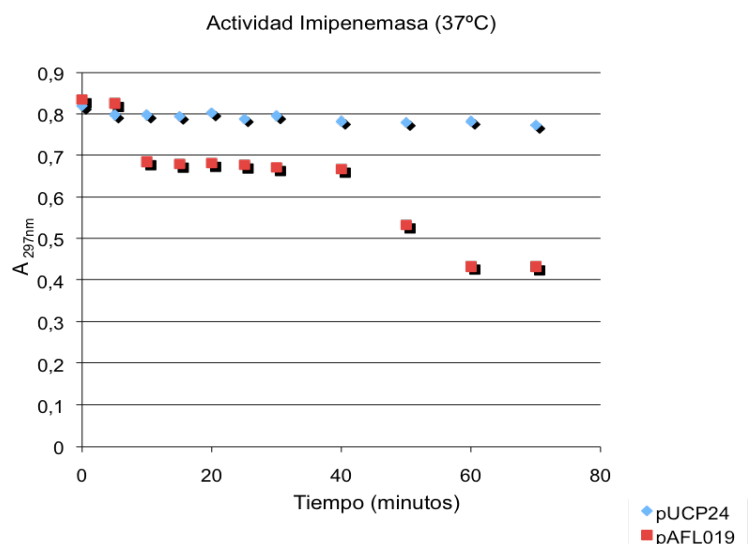


Figura 22: Análisis de la actividad imipenemasa. pUCP24: extracto proteico procedente de un cultivo bacteriano que contiene el plásmido pUCP24 sin inserto. pAFL019: extracto proteico procedente de un cultivo bacteriano que contiene el plásmido recombinante pAFL019 (Plásmido derivado de pUCP24 que lleva el gen *PA5542* de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1).

El imipenem absorbe la luz a una longitud de onda de 297nm. Como se observa en la Figura 22, cuando medimos la absorbancia a lo largo del tiempo de la mezcla de este antibiótico con los extractos proteicos, el extracto sonificado procedente del cultivo bacteriano que expresaba

la proteína PA5542 es capaz de hidrolizar imipenem (línea representada con puntos rojos), mientras que el extracto procedente de un cultivo bacteriano que no expresa la proteína apenas degrada dicho antibiótico (puntos azules). La actividad específica del extracto sonificado con el vector pUCP24 sin el inserto (puntos azules) es de 0,094 nmoles/min.mg de proteína mientras que la actividad específica del extracto sonificado con el vector pUCP24 que contiene el gen PA5542 clonado (puntos rojos) es de 1,366 nmoles/min.mg de proteína. Esto indica que la proteína codificada por el gen PA5542 es capaz de hidrolizar el antibiótico imipenem.

Finalmente, quisimos comprobar si este gen se encontraba presente en otros genomas que no fueran el de nuestra cepa de estudio 59.20. Para ello, analizamos por PCR la presencia del gen PA5542 en *P. aeruginosa* PAO1, PA14, 59.20, TB, así como en una serie de aislados clínicos (Figura 23).

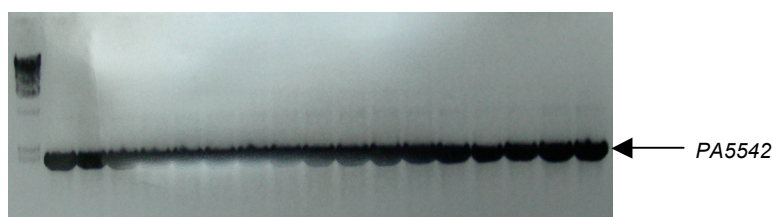


Figura 23: Amplificación del gen pA5542 en el ADN genómico de distintas cepas de *P. aeruginosa*. Los cuatro primeros carriles se corresponden con PAO1, PA14, 59.20 y TB, respectivamente. El resto son amplificaciones del gen en cepas clínicas cedidas por el Hospital Ramón y Cajal de Madrid.

Como se observa en la Figura 23, este gen está presente en el cromosoma de todas las cepas de *P. aeruginosa* analizadas, por lo que no se trata de una secuencia exclusiva de 59.20 adquirida por transferencia horizontal.

4.8.2 Análisis de la virulencia del mutante de delección en el gen PA5542 en la cepa PA14 y del mutante complementado

A continuación se analizaron los cambios en citotoxicidad y factores de virulencia regulados por QS para los mutantes de inserción, delección y el mutante de inserción complementado con el gen PA5542 utilizando el plásmido pMMB67-HE.

Tabla 16: Factores de virulencia: Resultados de los análisis de la producción de distintos factores de virulencia, de la formación de biofilm y de la citotoxicidad sobre macrófagos para los mutantes en el gen PA5542.

Factores de virulencia	AF07 (I)	AF09 (C)	AF22 (Δ)
Citotoxicidad	0,26	1,02	0,53
Elastasa	65,95	43,97	1,02
Caseinasa	48,30	50,05	1
Piocianina	17	16	0,95
Pioverdina	2,32	13,71	1,46
Biofilms	0,44	0,7	0,56

AF07: mutante de inserción en el gen PA5542. AF09: mutante complementado. AF22: mutante de delección en el gen PA5542. Los resultados están expresados como la razón entre el valor del mutante y el valor de su isogénica silvestre. (I): inserción, (C): complementado, (Δ): delección.

Como se muestra en la Tabla 16, el mutante de inserción AF07 es menos citotóxico que la estirpe silvestre en los ensayos de infección en la línea de macrófagos de ratón J774. Esta menor virulencia es debida, en parte, a que la cantidad de proteínas secretadas bajo condiciones que inducen el T3SS es sustancialmente menor que en la estirpe silvestre (Figura 24). En el mutante de inserción AF07, la producción de factores de virulencia regulados por QS está aumentada significativamente en todos ellos (especialmente las exoproteasas y la piocianina) con excepción de la formación de *biofilms*, que es menor (50%) a la de la estirpe silvestre.

Por otro lado, como se refleja en la Tabla 16, en el mutante complementado (AF09), la expresión del gen *PA5542* produce una recuperación de los niveles de citotoxicidad hacia valores similares a los de la cepa silvestre 59.20. La producción de elastasa en el mutante complementado (AF09) es menor que en el mutante de inserción AF07, sin embargo, su valor es muy superior al de la estirpe silvestre 59.20. Por otro lado, la producción de caseinasa y pioverdina sigue siendo mayor en el mutante complementado AF09 comparada con el mutante de inserción AF07 y la cepa silvestre. La complementación recupera, por tanto, parcialmente los niveles de los factores de virulencia de la estirpe silvestre 59.20.

Por otro lado, tanto el mutante de inserción (AF07) como el de delección (AF22) son menos citotóxicos que sus estirpes silvestres correspondientes y que el mutante complementado (AF09). Al deleccionar el gen, obtenemos el mismo comportamiento en este mutante (AF22) que en el de inserción AF07 en la producción de pioverdina y formación de *biofilms*.

Como se ha comentado anteriormente, el mutante de inserción en el gen *PA5542* (AF07) era menos citotóxico que su isogénica silvestre 59.20. Este fenotipo se mantenía en el mutante de delección AF22 y se recuperaba en el mutante complementado AF09. A continuación, se amplió el estudio de citotoxicidad mediante el análisis de la T3S en los mutantes y estirpes silvestres (Figura 24).

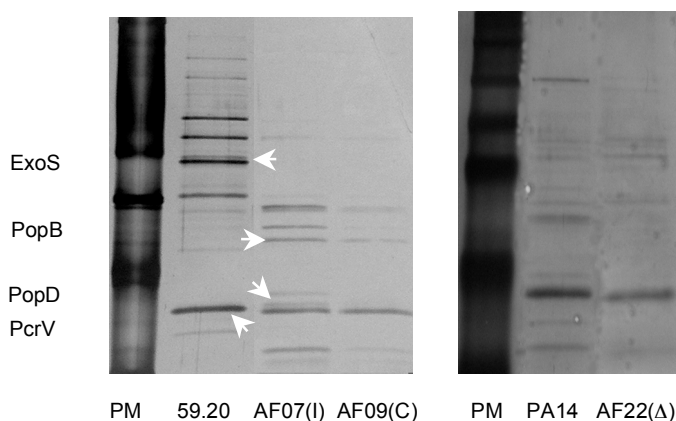


Figura 24: Patrón del T3SS del mutante de inserción en *PA5542* (I), mutante complementado (C) y mutante de delección (Δ). 59.20: estirpe silvestre para mutante de inserción AF07 y complementado AF09. PA14: cepa silvestre para mutante de delección AF22. En el gel están señaladas cuatro proteínas que forman parte de este sistema: ExoS (proteína efectora), PopB, PopD y PcrV que forman parte del sistema de translocación del T3SS.

Como puede observarse en la Figura 24, tanto el mutante de inserción (AF07) como el mutante de delección (AF22) presentaban una disminución en los niveles de T3S comparado con las cepas silvestres 59.20 y PA14, respectivamente. El mutante de inserción complementado con el gen *PA5542*, sin embargo, no recuperaba el fenotipo de la estirpe silvestre y presentaba una expresión del T3SS aún menor que el mutante de inserción AF07.

Finalmente, estudiamos el efecto que tenía la inserción, complementación y delección del gen *PA5542* sobre la motilidad de *P. aeruginosa* (Figura 25).

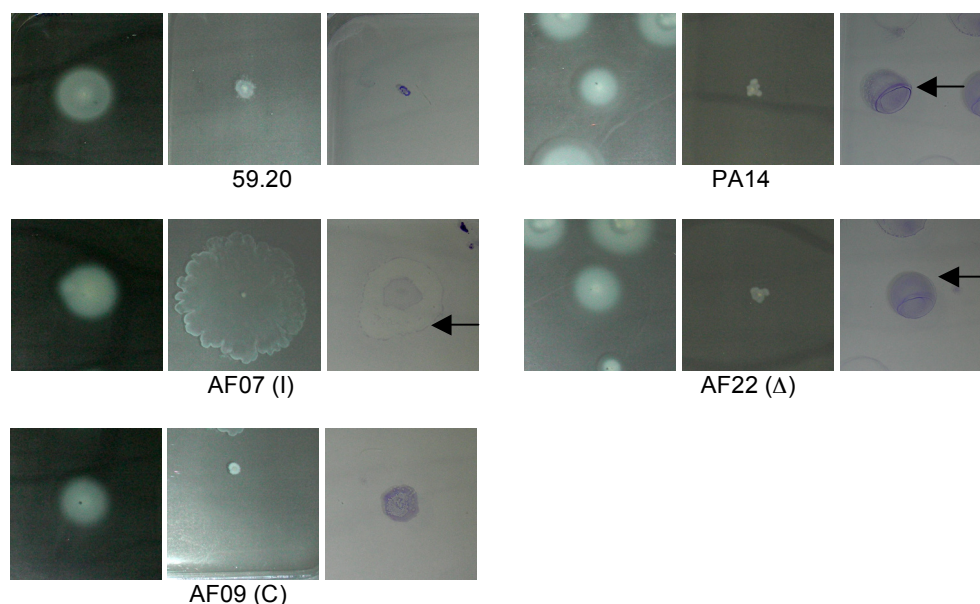


Figura 25: Ensayos de motilidad en los mutantes en el gen *PA5542*. Comparación de la motilidad tipo *swimming* (a), *swarming* (b) y *twitching* (c). 59.20: cepa silvestre de mutante de inserción (AF07) y mutante complementado (AF09). PA14: estirpe silvestre de mutante de delección (AF22). (I): inserción, (C): complementado, (Δ): delección. Con una flecha se señala el halo exterior del movimiento tipo *twitching*.

Al comparar la capacidad migratoria del mutante de inserción con respecto a su cepa silvestre, comprobamos que existen alteraciones claras en motilidad (Figura 25). Mientras que la inserción del transposón (AF07) parece no tener ningún efecto en la motilidad tipo *swimming*, es evidente que existe un aumento significativo en los otros dos tipos de motilidad: *swarming* y *twitching*.

La complementación del gen (AF09) revierte el fenotipo del mutante tanto en la motilidad tipo *swarming* como *twitching*.

La delección del gen (AF22) no produce ningún efecto en la motilidad en la cepa PA14 de *P. aeruginosa*.

La expresión de la proteína *PA5542* complementa, tan solo parcialmente, los fenotipos descritos de virulencia del mutante de inserción para dicho gen. Por otro lado, existen diferencias entre el mutante de delección y el mutante de inserción. Estos dos mutantes se obtuvieron en cepas diferentes de *P. aeruginosa*. Como se ha podido ver en apartados anteriores estas dos cepas presentan fenotipos distintos de sensibilidad a los antibióticos y expresión de factores de virulencia, de modo que las variaciones presentes en estos dos mutantes pueden ser debidas a que se obtuvieron en dos cepas silvestres de *P. aeruginosa*: 59.20 para el mutante de inserción y PA14 para el mutante de delección.

Debido al fenotipo que presenta en los ensayos espectrofotométricos de degradación de imipenem, el gen *PA5542* es capaz de hidrolizar este antibiótico y por lo tanto, está implicado en la resistencia a los antibióticos de *P. aeruginosa*. Por otro lado, la proteína codificada por dicho gen parece desempeñar un papel en la virulencia de esta bacteria, ya que mutaciones en dicho gen producen cambios significativos en citotoxicidad y secreción de otros determinantes de patogenicidad de *P. aeruginosa*. Queda, por tanto, esclarecer cuál es la función de la proteína *PA5542* en la virulencia de este microorganismo.

4.9 Análisis de una proteína perteneciente a un sistema implicado en la modulación intracelular de los niveles de di-GMPc

Otro de los mutantes analizados fue el mutante denominado AF16. Este mutante pertenece a la genoteca obtenida por la inserción del transposón en la cepa de *P. aeruginosa* TB. La mutación se encuentra en el gen *PA3704*, que codifica la proteína WspE. Como se ha mencionado previamente, esta proteína forma parte del sistema regulador Wsp, que regula, entre otros eventos, la formación de *biofilms* mediante la modulación intracelular de los niveles de di-GMPc (146). La proteína WspE presenta un 48% de similitud con la proteína reguladora FrzE implicada en la motilidad tipo *gliding* de *Myxococcus xanthus* (228), aunque su función exacta se desconoce por el momento.

Para tener una demostración del fenotipo de virulencia y de sensibilidad a los antibióticos obtenido para el mutante de inserción en el gen *PA3704*, se hicieron dos abordajes experimentales complementarios. Por una parte, se obtuvo un mutante por delección del gen *PA3704* y por otra, se clonó dicho gen en el plásmido pMMB67-HE. Una vez obtenidas estas cepas, se analizaron sus características fenotípicas. Tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos, en una de las etapas de la construcción del mutante de delección, los transconjugantes se seleccionan en presencia de estreptomina. La cepa silvestre TB, al igual que sucede con la cepa 59.20, es muy resistente a dicho antibiótico, por lo que decidimos construir el mutante de delección en *wspE* en otras estirpes silvestres de *P. aeruginosa*. Para este mutante eliminamos el gen en dos cepas silvestres de *P. aeruginosa*: PAO1 y PA14.

Para construir el mutante de delección se utilizó el vector suicida pKNG101 (169). Se amplificaron mediante PCR los dos fragmentos que flanquean en el cromosoma bacteriano al gen *PA3704* (fragmentos "E": 556pb y "F": 606pb). Para ello se utilizaron los oligonucleótidos denominados OAA21, OAA22 para amplificar el fragmento "E", OAA23 y OAA24 para amplificar el fragmento "F" (ver Materiales y Métodos). Se clonó en pKNG101 el fragmento de 1162pb (fragmento "EF") resultante de la amplificación conjunta de los dos fragmentos. El gen fue eliminado del cromosoma de *P. aeruginosa* PAO1 y PA14 mediante recombinación homóloga en dos pasos (Figura 26).

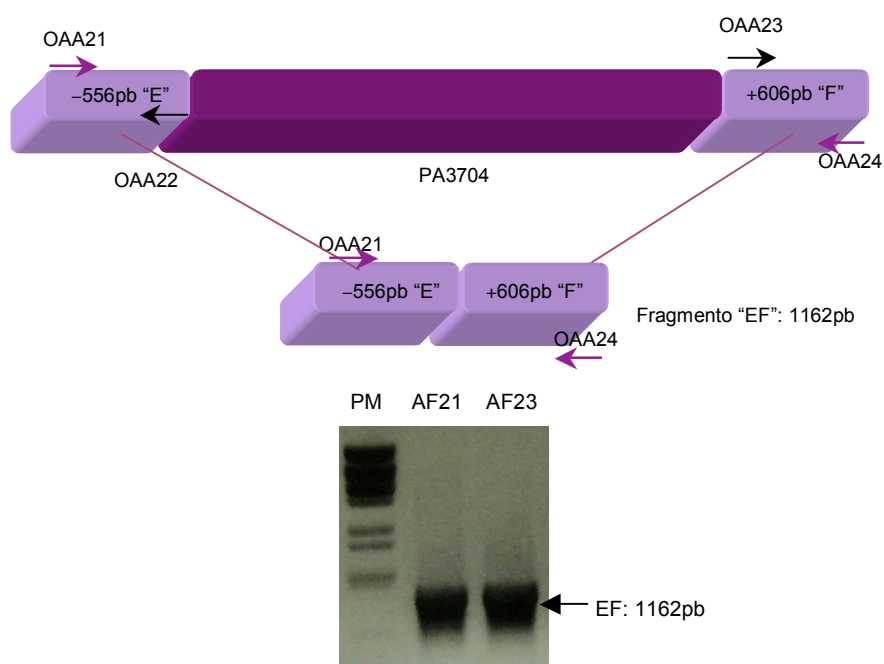


Figura 26: Esquema de la delección del gen *PA3704* del cromosoma de PAO1 y PA14. En el gel de agarosa se muestra señalado con una flecha la comprobación por PCR de la delección del gen *PA3704* del cromosoma de PAO1 y PA14. PM: peso molecular. AF21: mutante de delección en el gen *PA3704* en el cromosoma de PAO1. AF23: mutante de delección en el gen *PA3704* en el cromosoma de PA14.

En primer lugar, analizamos los cambios en sensibilidad a los antibióticos de los mutantes comparados con la estirpe silvestre.

Tabla 17: Concentraciones mínimas inhibitorias ($\mu\text{g/ml}$) para los mutantes en el gen *wspE*: *PA3704*.

Cepa	Polimixina	Amicacina	Ciprofloxacino	Tetraciclina	Imipenem	Ceftazidima
TB	2-4	2-4	0,06	16	8	2
AF16 (I)	2-4	2-4	0,03	32	4	16-32
AF18 (C)	1	1	0,015	4	1	16
PAO	2	1	0,06	16	2	0,5
AF21 (Δ)	2	1	0,06	8	2	0,5
PA14	2	0,5-1	0,06	8	1	0,5
AF23 (Δ)	2	0,25-0,5	0,06	8	1	0,5

Tb (silvestre). AF16 (mutante de inserción). AF18: mutante de inserción complementado. PAO: cepa silvestre para mutante de delección AF21. PA14: cepa silvestre para mutante de delección AF23

En los ensayos de sensibilidad a los antibióticos, el mutante de inserción en el gen *PA3704* presentaba una sensibilidad mayor a ciprofloxacino y tetraciclina, mientras que su CMI para imipenem y ceftazidima era superior a la de la estirpe silvestre (Tabla 17). La expresión de *wspE* desde un promotor heterólogo disminuye drásticamente las CMIs de los distintos antibióticos. Los mutantes de delección en PAO1 y PA14 no muestran diferencias de sensibilidad con respecto a la cepa silvestre correspondiente.

Al igual que para el resto de mutantes con cambios en citotoxicidad y resistencia, ampliamos el estudio de los determinantes de virulencia en este mutante y analizamos la formación de *biofilms*, actividad de proteasas, motilidad, piocianina y pioverdina. Los resultados derivados de estos análisis se resumen en la Tabla 18.

Tabla 18: Factores de virulencia: Resultados de los análisis de la producción de distintos factores de virulencia, de la formación de *biofilms* y de la citotoxicidad sobre macrófagos para los mutantes en el gen *wspE*: *PA3704*.

Factores de virulencia	AF16 (I)	AF18 (C)	AF21 (Δ)	AF23 (Δ)
Citotoxicidad	7,208	0,569	0,863	5,238
Caseinasa	1,054	0,990	1,034	1,027
Pioverdina	3,863	25,777	2,437	1,242
Piocianina	0,479	0,763	0,505	0,527
Elastasa	1,404	1,610	0,971	0,861
Biofilms	2,168	0,101	0,736	2,460

AF16: mutante de inserción en el gen *PA3704*. AF18: mutante complementado. AF21: mutante de delección en el gen *PA3704* en PAO1 y AF23: mutante de delección en el gen *PA3704* en PA14. Los resultados están expresados como la razón entre el valor del mutante y el valor de su isogénica silvestre. (I): inserción, (C): complementado, (Δ): delección.

El mutante de inserción en *PA3704* (AF16) es siete veces más citotóxico que la estirpe silvestre 59.20. Este fenotipo se correlacionaba con unos niveles de secreción de proteínas ligeramente superior que TB en el patrón de T3SS (Figura 27). De los factores de virulencia regulados por QS detallados en la Tabla 18, la inserción del transposón en *PA3704* no produce ninguna variación en los niveles de caseinasa en *P. aeruginosa*. Esta mutación, en cambio, provoca un aumento en la producción de elastasa, pioverdina y formación de *biofilms*; mientras que disminuye la secreción de pirocianina.

La expresión del gen *PA3704* desde un promotor heterólogo (AF18) produce un aumento drástico en los niveles de pioverdina del mutante con respecto a TB y al mutante de inserción (AF16). Por otro lado, la producción de *biofilms* es 10 veces menor en el mutante complementado AF18 que la cepa silvestre TB y 20 veces menor que el mutante de inserción (AF16) en *PA3704*. En este caso, la expresión de *pA3704* en el mutante de inserción complementa parcialmente la mutación en dicho gen.

Los mutantes de delección (AF21 y AF23) tienen un comportamiento similar al mutante de inserción en *PA3704* excepto en la citotoxicidad y la producción *biofilms*, donde el mutante de delección en *PA3704* en PAO1 (AF21) no presenta el mismo fenotipo que en PA14 (AF23) y en el mutante de inserción AF16.

A continuación medimos la T3S de los mutantes de delección para el gen en estudio, inserción, y mutante de inserción complementado (Figura 27).

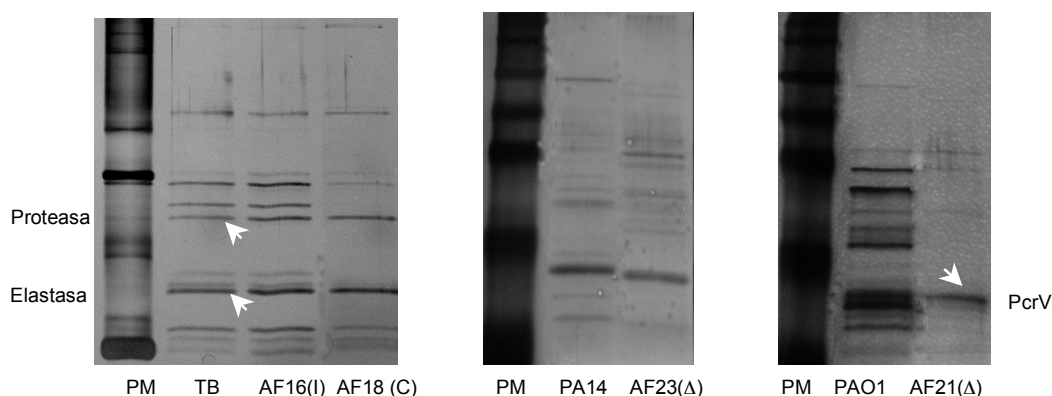


Figura 27: Patrón de T3SS del mutante de inserción en *PA3704* (I), mutante complementado (C) y de delección (Δ). TB: cepa silvestre para mutante de inserción y complementado. PAO1: cepa silvestre para el mutante de delección AF21. PA14: cepa silvestre para el mutante de delección AF23. AF12: cepa silvestre TB que sobreexpresa el gen *PA3704*.

Como se observa en la Figura 27, el mutante de inserción AF16 tiene unos niveles de T3S ligeramente superiores a los de la cepa silvestre TB. La expresión del gen *wspE* (AF18) disminuye la expresión del T3SS en el mutante complementado AF18. La delección del gen en la cepa PAO1 produce una reducción significativa del T3SS, mientras que en PA14, el patrón del mutante de delección AF23 está alterado con respecto a la cepa silvestre.

Finalmente quisimos ver si la sobreexpresión de este gen o su delección tenían un efecto en la motilidad de *P. aeruginosa* (Figura 28).

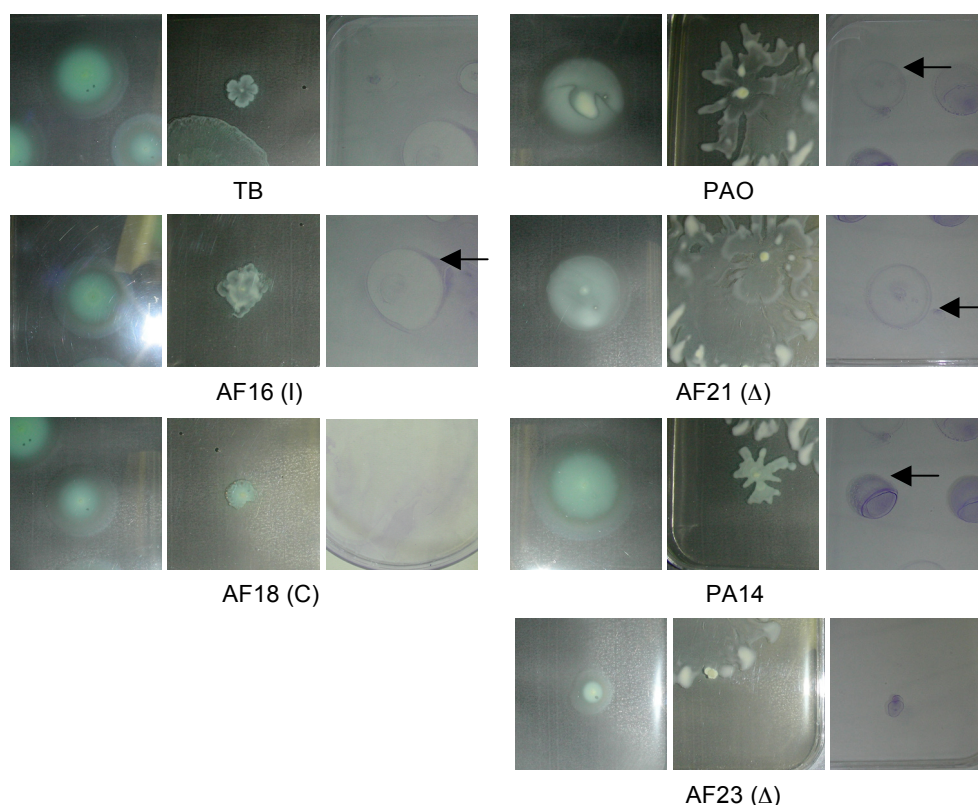


Figura 28: Ensayo de motilidad para el ver el efecto de la inserción (AF16), complementación (AF18) o delección (AF21 en PAO1 y AF23 en PA14) del gen *PA3704* en *P. aeruginosa*. (I): inserción, (C): complementado, (Δ): delección. Con una flecha se señala el halo externo del movimiento tipo *twitching*

La inserción del transposón en el gen *PA3704* (AF16) no parece tener efectos en la motilidad tipo *swimming*, mientras que sí se observa un claro aumento de la capacidad migratoria del mutante sobre medio semisólido (*swarming*) y en superficie (*twitching*).

La expresión del gen *PA3704* (AF18) incrementan la motilidad tipo *swimming* de *P. aeruginosa*. Por otro lado, el mutante complementado AF18 recupera el fenotipo de la estirpe silvestre TB en el movimiento tipo *swarming* y *twitching*.

El mutante de delección en el gen *PA3704* en la cepa PAO1 (AF21) muestra una mayor capacidad de *swarming*, al igual que el mutante de inserción para este gen en la cepa TB. En el movimiento tipo *twitching* parece tener una mayor capacidad que TB, y no presenta cambios significativos para el movimientos tipo *swimming* en comparación con la cepa silvestre PAO1. La delección del gen *PA3704* en PA14 (AF23) provoca una significativa disminución de la capacidad migratoria del mutante en comparación con la estirpe silvestre en los tres tipos de movimiento analizados.

LA expresión de la proteína *PA3704* (WspE) complementa, sólo muy parcialmente, los fenotipos descritos de sensibilidad a los antibióticos y virulencia del mutante de inserción para dicho gen. Por otro lado, las diferencias observadas entre los mutantes de delección y el mutante de inserción pueden ser debidas a que los mutantes se obtuvieron en cepas silvestres de *P. aeruginosa* diferentes (TB para el mutante de inserción y PAO1 y PA14 para el mutante de delección).

4.10 Análisis de un posible transportador tipo RND implicado en la resistencia y la virulencia de *P. aeruginosa*

El último de los mutantes seleccionados para un estudio más en profundidad pertenece también a la genoteca obtenida a partir de la cepa silvestre de *P. aeruginosa* TB. Se trata del mutante denominado AF13. La inserción del transposón se encuentra en el gen *PA2527*. Este gen codifica un transportador que forma parte de un sistema MDR de tipo RND (*Resistance-Nodulation Cell Division*). El gen *PA2527* codifica una proteína que presenta una similitud del 82% con la proteína de *E. coli* YegN (que se conoce también con el nombre MdtB). Este gen forma parte del operón *yegMNO* o *MdtABC* (*Multidrug transporter ABC*), que codifica una bomba de expulsión de drogas tipo RND que confiere resistencia a novobiocina y derivados de sales biliares. Este operón ha sido caracterizado en el momento de escribir esta Tesis (241) y se ha denominado *MuxABC-OpmB*. El gen *PA2527* se corresponde con el gen *muxB* de este operón.

Para tener una demostración del fenotipo de virulencia y de sensibilidad a los antibióticos obtenido para el mutante de inserción en el gen *PA2527*, se hicieron dos abordajes experimentales complementarios. Por una parte, se obtuvo un mutante por delección del gen *PA2527* y por otra, se clonó dicho gen en el plásmido pMMB67-HE tal y como se describe previamente en Materiales y Métodos. Una vez obtenidas estas cepas, se analizaron sus características fenotípicas.

Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, debido a los problemas para obtener el mutante de delección en la cepa silvestre TB, decidimos construir el mutante en otras estirpes silvestres de *P. aeruginosa*. En este caso, el mutante en el gen *PA2527* se obtuvo en la cepa de *P. aeruginosa* PAO1.

Para construir el mutante de delección se utilizó el vector suicida pKNG101 (169). Se amplificaron mediante PCR los dos fragmentos que flanquean en el cromosoma bacteriano al gen *PA2527* (fragmentos "G": pb y "H": pb). Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos denominados OAA5, OAA6 para amplificar el fragmento "G", OAA7 y OAA8 para amplificar el fragmento "H" (ver Materiales y Métodos). Se clonó en pKNG101 el fragmento de 1415pb (fragmento "GH") resultante de la amplificación conjunta de los dos fragmentos. El gen fue eliminado del cromosoma de *P. aeruginosa* PAO1 mediante recombinación homóloga en dos pasos (Figura 29).

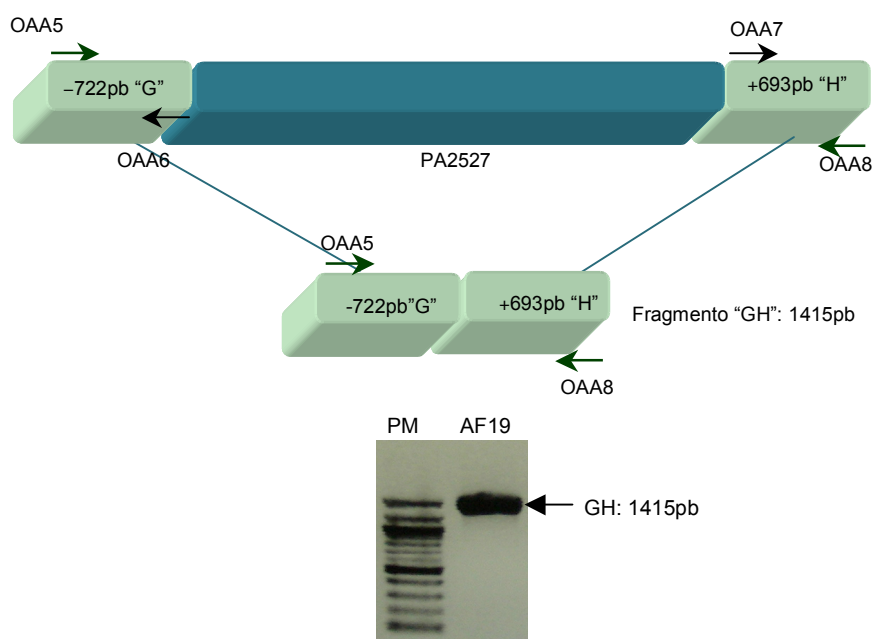


Figura 29: Esquema de la delección del gen *PA2527* del cromosoma de PAO1. En el gel de agarosa se muestra con una flecha la comprobación por PCR de la delección del gen *PA2527* del cromosoma de PAO1. PM: peso molecular. AF19: mutante de delección en el gen *PA2527* en el cromosoma de PAO1

Lo primero que se estudió fue el perfil de sensibilidad a los antibióticos de los mutantes de inserción, complementación y delección comparados con sus isogénicas silvestres (Tabla 19)

Tabla 19: Concentraciones mínimas inhibitorias ($\mu\text{g/ml}$) para los mutantes en el gen *muxB: PA2527*.

Cepa	Polimixina	Amicacina	Ciprofloxacino	Tetraciclina	Imipenem	Ceftazidima
TB	2-4	2-4	0,06	16	8	2
AF13 (I)	1	8	0,25	32	8	1
AF15 (C)	1	0,5	0,03	64	1	0,25
PAO	2	1	0,06	16	2	0,5
AF19 (Δ)	1	1	0,06	16	4	0,5

Tb (silvestre). AF13 (mutante de inserción). AF15 (mutante complementado). PAO (estirpe silvestre del mutante de delección). AF19 (mutante de delección del gen *PA2527* en PAO1). (I): inserción, (C): complementado, (Δ): delección.

Como se observa en la Tabla 19, la inserción en el gen *PA2527* provocaba un aumento de la sensibilidad del mutante a polimixina y ceftazidima comparado con el fenotipo de la cepa silvestre TB. Por otro lado, este mutante mostraba unos valores de CMI para amicacina, ciprofloxacino y tetraciclina mayores que TB, tal y como se muestra en la Tabla 19.

La expresión del gen *PA2527* en el mutante complementado AF15 recupera las CMI incluso a valores más bajos que los de la estirpe silvestre para amicacina y ciprofloxacino. El mutante complementado es, además, más sensible a imipenem y ceftazidima y presenta una CMI a tetraciclina superior que el mutante de inserción AF13 y la cepa silvestre TB.

El mutante con delección en el gen *PA2527* es menos sensible a imipenem (fenotipo no observado en el mutante de inserción) que su cepa silvestre PAO1 y la CMI para polimixina es inferior al de la estirpe silvestre, como sucedía con el mutante de inserción en *PA2527*.

A continuación se hizo el estudio de citotoxicidad y análisis de los factores de virulencia regulados por la respuesta QS en estos mutantes (Tabla 20).

Tabla 20: Factores de virulencia: Resultados de los análisis de la producción de distintos factores de virulencia, de la formación de *biofilm* y de la citotoxicidad sobre macrófagos para los mutantes en el gen *muxB: PA2527*.

Factores de virulencia	AF13 (I)	AF15 (C)	AF19 (Δ)
Citotoxicidad	0,05	0,04	0,38
Elastasa	1,33	0,003	1,68
Caseinasa	1,13	0,04	1,42
Piocianina	1,19	0,18	1,93
Pioverdina	1,11	0,07	1,01
Biofilms	0,36	1,09	0,73

AF13: mutante de inserción en el gen *PA2527*. AF15: mutante de complementación. AF19: mutante de delección para *PA2527*. Los resultados están expresados como la razón entre el valor del mutante y el valor de su isogénica silvestre. (I): inserción, (C): complementado, (Δ): delección.

Como muestra la Tabla 20 el mutante de inserción AF13 presentaba una menor citotoxicidad y menor producción de *biofilms* con respecto a la estirpe silvestre. Para el resto de factores de virulencia no había grandes diferencias entre los valores del mutante AF13 y la cepa silvestre TB.

Cuando complementamos el mutante con el gen *PA2527* (AF15) todos los factores de virulencia, menos la formación de *biofilms*, que recupera los niveles de la cepa silvestre TB y la citotoxicidad que mantiene el valor del mutante de inserción, experimentan un descenso drástico con respecto a los mutantes de inserción (AF13), delección (AF19) y estirpe silvestre (TB).

Por último, cabe destacar que tanto el mutante de inserción (AF13) como el de delección (AF19) presentan el mismo fenotipo en todos los factores de virulencia analizados.

Como medida de la citotoxicidad de los mutantes analizamos también la T3S (Figura 30)

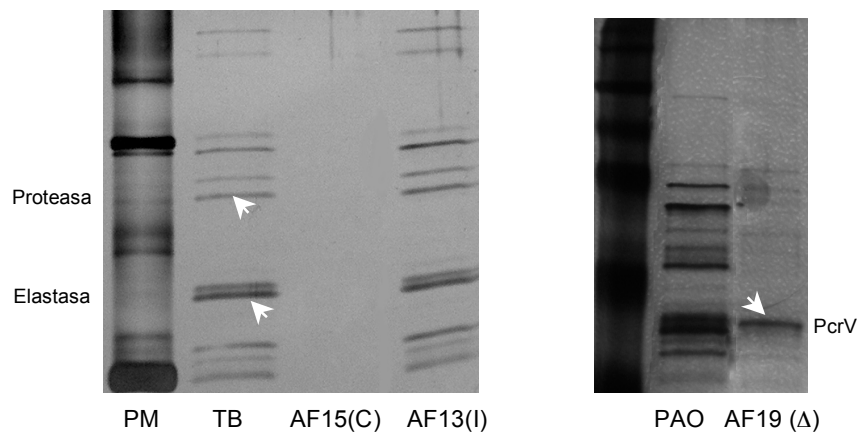
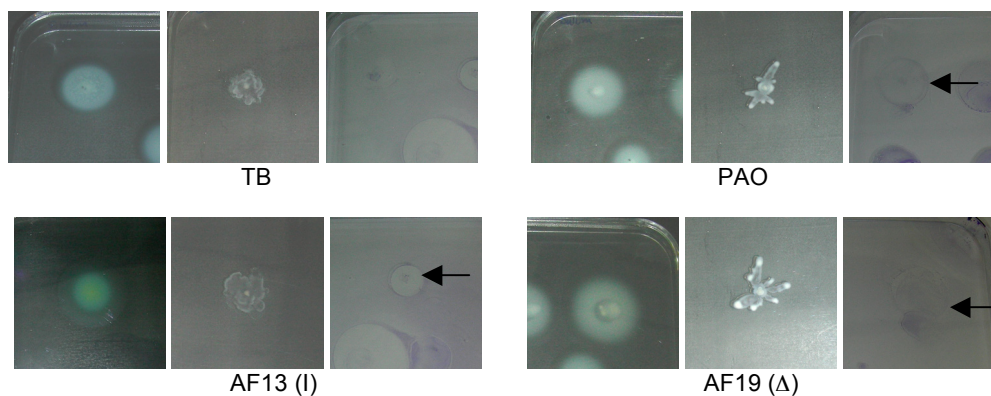


Figura 30: Patrón de secreción tipo III del mutante de inserción (I), complementado (C) y delección (Δ) en el gen *muxB*: *PA2527*

Como se muestra en la Figura 30, el mutante de inserción presenta unos niveles de T3S similares a la cepa silvestre TB. La complementación de la mutación en el mutante de inserción, al igual que sucedía con el resto de factores de virulencia, baja significativamente la expresión del T3SS. La delección del gen *muxB* en PAO1 provoca una disminución de la T3S con respecto a la cepa silvestre.

Finalmente analizamos si la expresión de este gen desde un promotor heterólogo, su inserción o su delección tenían un efecto en la motilidad de *P. aeruginosa* (Figura 31).



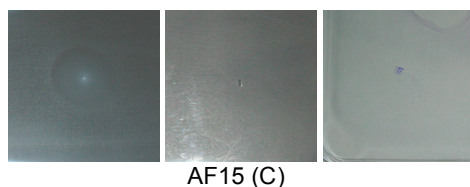


Figura 31: Ensayos de motilidad en los mutantes en el gen *muxB*: PA2527. Comparación de la motilidad de tipo *swimming* (a), *swarming* (b) y *twitching* (c). (I): inserción, (C): complementado, (Δ): delección.

Como se observa en la Figura 31, la inserción del transposón en el gen PA2527 produce cambios en los tres tipos de motilidad de *P. aeruginosa*, especialmente en la motilidad tipo *swimming* y *twitching* donde se observa una mayor capacidad migratoria del mutante comparado con TB.

Por otro lado, la expresión de PA2527 produce una desaparición total de la capacidad de migración del mutante en medio semisólido (*swarming*) y en superficie (*twitching*), mientras que mantiene su capacidad de migración en medio líquido (*swimming*).

Al deleccionar el gen no observamos cambios de motilidad significativos entre la estirpe silvestre y el mutante AF19.

A la vista de los resultados, podemos concluir que *muxB* no sólo está implicado en la resistencia a los antibióticos de *P. aeruginosa*, función que se podría intuir al tratarse de un gen que codifica un componente de un sistema MDR; si no que además parece tener un papel en la virulencia de este microorganismo, ya que tanto la mutación por inserción como la delección de dicho gen influyen negativamente en la citotoxicidad y la capacidad de formación de biofilms de *P. aeruginosa*. Un dato curioso a tener en cuenta y que se discutirá posteriormente es que la expresión de este gen en el mutante de inserción provoca que la secreción de los factores de virulencia regulados por el sistema QS disminuya significativamente, lo que podría significar que la bomba de la que forma parte *muxB* participe en los procesos de señalización regulados por dicho sistema.

4.11 Modelos *in vivo* de infección pulmonar aguda y crónica con *P. aeruginosa*

Puesto que *P. aeruginosa* produce infecciones pulmonares crónicas y agudas, nos propusimos estudiar, usando modelos de ratón, la relevancia en el proceso patológico de los mutantes AF13 y AF16 que tienen las inserciones en los genes *muxB* (PA2527) y *wspE* (PA3704), respectivamente. Ambos mutantes pertenecen a la genoteca obtenida en la cepa silvestre TB de *P. aeruginosa*. En experimentos previos *in vitro* de citotoxicidad sobre la línea de macrófagos de ratón J774, el mutante AF13 (mutante de inserción en el gen PA2527) era menos citotóxico que la estirpe silvestre (apartado 3.10). Por el contrario, el mutante AF16 (mutante de inserción en el gen PA3704) presentaba una mayor citotoxicidad que TB (apartado 3.9).

4.11.1 Infección aguda

4.11.1.1 Porcentaje de supervivientes

Para medir la virulencia de los mutantes de inserción y la cepa silvestre TB se llevaron a cabo ensayos de infección aguda y crónica en ratones de la cepa C57BL/6J. El primer parámetro que se midió fue el porcentaje de supervivientes tras siete días después de infección aguda y crónica.

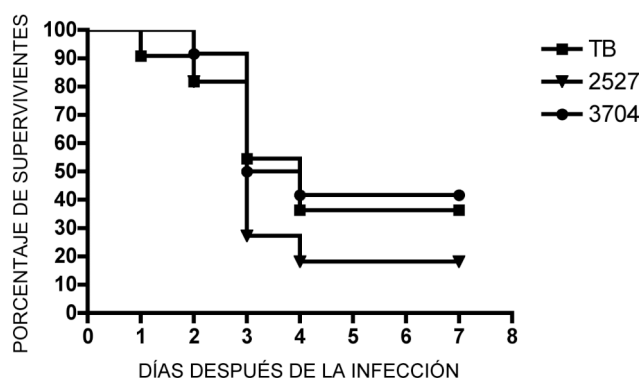


Figura 32: Porcentaje de supervivientes tras siete días después de la infección aguda. TB: cepa silvestre. 2527: mutante de inserción en el gen *PA2527 (muxB)*. 3704: mutante de inserción en el gen *PA3704 (wspE)*.

Como se observa en la Figura 32 no hay diferencias significativas en cuanto al número de ratones vivos infectados con la cepa silvestre TB o con cualquiera de los dos mutantes de inserción después de siete días tras la infección aguda.

4.11.2 Infección crónica

4.11.2.1 Porcentaje de supervivientes

Al igual que sucedía en la infección aguda, como se muestra en la Figura 33, no se observan diferencias en el porcentaje de supervivientes entre los dos mutantes de inserción y la cepa silvestre TB. Aproximadamente el 50% de los ratones infectados con la cepa silvestre o con los mutantes de inserción mueren tras siete días de infección crónica.

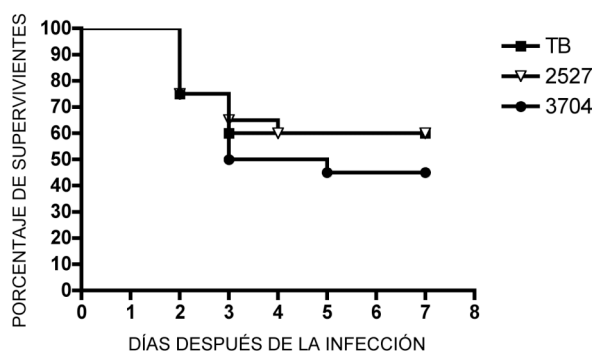


Figura 33: Porcentaje de supervivientes tras siete días después de la infección crónica. TB: cepa silvestre. 2527: mutante de inserción en el gen *PA2527 (muxB)*. 3704: mutante de inserción en el gen *PA3704 (wspE)*.

En los animales que estaban vivos después de siete días tras la infección crónica se llevó a cabo un análisis histopatológico del pulmón izquierdo. Se hizo una medida de la inflamación basada en la presencia de exudado y en el porcentaje de células inflamatorias presentes en el tejido bronquial y pulmonar. Se determinó que la mayoría de los animales infectados tanto con la cepa silvestre como en los mutantes de inserción presentaban una inflamación focal débil del

tejido. También se analizó el tipo de infiltrado celular presente en los pulmones de los animales infectados. Al igual que con el parámetro anterior no había diferencias significativas entre la cepa silvestre y los mutantes. En un alto porcentaje de animales el tipo celular predominante era de polimorfonucleares: de un 50-90% en relación al número de monocitos, linfocitos y células plasmáticas presentes en el tejido pulmonar.

Sin embargo, en infección crónica, además de mortandad, se miden otros parámetros como son el número de ratones vivos que presentan recuento bacteriano después de 7 días de infección. Este dato nos da una idea de la persistencia de cada cepa en el pulmón, y por tanto, de su capacidad potencial de producir infección crónica.

4.11.2.2 Recuento bacteriano en los ratones vivos al cabo de siete días después de la infección

En la Tabla 21 se muestra que, aunque no hay diferencias significativas en cuanto al número total de ratones vivos después de la infección crónica, sí existen diferencias relativas a la capacidad del ratón de eliminar la cepa TB (silvestre) y el mutante AF13 (mutante de inserción en el gen *PA2527: muxB*) con respecto al mutante AF16 (mutante de inserción en el gen *PA3704: wspE*).

Tabla 21: Número de ratones vivos tras 7 días de infección crónica..

Cepa	Número total de ratones vivos tras siete días de infección	Número de ratones sin <i>P. aeruginosa</i> en el pulmón	Número de ratones con <i>P. aeruginosa</i> en el pulmón
TB	12	7	5
AF13	12	3	9
AF16	9	5	4

TB: cepa silvestre. AF13: mutante de inserción en el gen *PA2527 (muxB)*. AF16: mutante de inserción en el gen *PA3704 (wspE)*

El mutante AF13 parece tener una mayor persistencia en el pulmón del ratón (de los 12 ratones vivos que hay al cabo de los siete días, sólo 3 ratones han conseguido eliminar la presencia de *P. aeruginosa* del tejido pulmonar), en comparación con las otras dos cepas. Tanto los ratones infectados con la cepa silvestre TB como los ratones infectados con el mutante en *wspE* son capaces de eliminar de forma más eficaz la infección por *P. aeruginosa* que el mutante en el gen *PA2527*. Por tanto, esto indicaría que una mutación en el gen *muxB* proporcionaría a la bacteria una posible ventaja a la hora de producir una infección crónica.

Un dato complementario al de la Tabla 21 es el que se observa en la Figura 34; donde se muestra el recuento bacteriano de los pulmones de los ratones vivos tras 7 días de infección crónica. Este recuento nos da un valor cuantitativo de la permanencia de las bacterias en el pulmón de los ratones.

producir una infección aguda). Mientras que el mutante de inserción en el gen *PA2527* (*muxB*) tendría una capacidad de persistencia en tejido pulmonar mayor que la cepa silvestre y que el mutante en *PA3704* (*wspE*), lo que podría darle una cierta ventaja a la hora de producir infección crónica en los pacientes infectados por dicho mutante.

5 Discusión

Una terapia antimicrobiana inadecuada es crítica en la evolución de diversas infecciones bacterianas (141, 158). El tratamiento de las enfermedades infecciosas ha mejorado con la introducción de nuevos antimicrobianos más efectivos, sin embargo, en las últimas décadas ha ido creciendo el número de microorganismos resistentes a los antibióticos, así como la mortalidad entre los pacientes con enfermedades infecciosas (286). Como consecuencia de esta situación, es necesario comprender los mecanismos de resistencia y su influencia en la virulencia bacteriana, con el fin de desarrollar alternativas terapéuticas frente a estos patógenos multirresistentes. El aumento de la incidencia de resistencia múltiple se ha atribuido a una combinación de las características intrínsecas y la capacidad evolutiva de los patógenos unido al uso indiscriminado de los antimicrobianos. Comprender y eventualmente solucionar (o al menos disminuir) este problema requiere el establecimiento de protocolos de control de la infección, un uso coherente de los antibióticos existentes y el desarrollo de nuevas terapias antimicrobianas. La diversidad de mecanismos de resistencia en las bacterias dificulta este proceso. Un claro ejemplo de patógeno multirresistente es *P. aeruginosa* (279, 334). Este patógeno oportunista juega un papel fundamental como agente infeccioso en pacientes con FQ (126) y es uno de los principales microorganismos causantes de infecciones hospitalarias. *P. aeruginosa* es capaz de sobrevivir en ambientes muy diversos (335) y utiliza un amplio arsenal de factores de virulencia para infectar un gran rango de hospedadores, incluyendo plantas, animales y personas (280). Es un patógeno intrínsecamente resistente muy difícil de erradicar. Se ha considerado tradicionalmente que la resistencia intrínseca de este patógeno reside entre otros factores en una baja permeabilidad de la envuelta celular así como un amplio número de sistemas de bombeo múltiple de drogas (253). Sin embargo, hasta el comienzo del trabajo de esta Tesis Doctoral, no se había hecho un análisis sistemático de otros posibles mecanismos que contribuyan a dicha resistencia intrínseca.

En este trabajo abordamos el estudio de los determinantes de resistencia en dos cepas de *P. aeruginosa*: 59.20 y TB. Para ello, utilizamos dos genotecas de inserción (77, 374) generadas en dichas cepas y seleccionamos mutantes con una sensibilidad alterada (mutantes más o menos sensibles que su isogénica silvestre) frente a seis antibióticos pertenecientes a diferentes familias estructurales (polimixina, amicacina, ciprofloxacino, tetraciclina, imipenem y ceftazidima). Este abordaje nos ha permitido no sólo el descubrimiento de nuevos determinantes cuya inactivación incrementa la resistencia en *P. aeruginosa* frente a un antibiótico determinado sino también identificar aquellos genes cuya inactivación hacían a la bacteria más sensible a ciertos antimicrobianos. Los estudios discutidos en la presente memoria de doctorado, así como trabajos realizados en paralelo por otro grupos de investigación (37, 89, 102, 312, 394) nos indican que hay un amplio número de genes implicados en los procesos de resistencia de esta bacteria que hasta ahora eran totalmente desconocidos.

5.1 Mutantes de *P. aeruginosa* con cambios en la sensibilidad a los antibióticos

Como se ha indicado, desde el momento en que se inició este trabajo, se han publicado algunos estudios semejantes, la mayor parte de ellos, utilizando una genoteca de inserción exhaustiva generada en la cepa PA14 de *P. aeruginosa* (203). Al comparar nuestro estudio con estos trabajos en *P. aeruginosa* PA14, vemos que tan sólo unos pocos mutantes coinciden entre los diferentes análisis (37, 89, 102, 312). Aunque estas diferencias pueden explicarse en parte porque las genotecas que hemos analizado son menos exhaustivas que la generada en PA14 (203), hay otras razones que podrían explicar estas discrepancias. Las diferentes cepas de *P. aeruginosa* comparten un amplio número de genes (*core genome*), sin embargo, los genes accesorios son distintos. Este hecho podría influenciar el fenotipo de resistencia de cada cepa.

Por ejemplo, en nuestro estudio algunos de los genes seleccionados están en islas de patogenicidad ausentes tanto en PAO1 como en PA14. Además, los niveles de expresión de distintos elementos pertenecientes al *core genome* son diferentes en las distintas estirpes, sobre todo cuando tienen un origen clínico, como es el caso de las cepas TB (353) y 59.20 (237) usadas en nuestro estudio. Como se ha discutido en la Introducción, las cepas infectivas evolucionan cambiando los patrones de expresión de un gran número de genes. De hecho, tal y como se observa en la Tabla 4, al comparar los valores de CMI de nuestras dos cepas silvestres con las dos cepas de *P. aeruginosa* PAO1 y PA14 tomadas como referencia en la mayoría de los estudios, hay diferencias en los valores de sensibilidad frente a los seis antibióticos del análisis. No es, por tanto, de extrañar que una parte importante del resistoma intrínseco de las bacterias sea específico de la estirpe que se esté analizando. A pesar de que se ha descrito que todas las cepas de *P. aeruginosa*, tanto de origen clínico como medioambiental son semejantes, tanto genética como funcionalmente (7, 243), es también cierto que las distintas cepas tienen comportamientos diferentes (195). Por ejemplo las cepas PA14 y PAO1 producen una respuesta diferencial cuando infectan *Dyctiostelium discoideum* (50) y las cepas PAO1 y dos clones distintos de TB tienen también una respuesta diferente frente a estrés oxidativo (300).

De hecho, otros estudios basados en el análisis de mutantes de inserción de la cepa TB, indican que las inserciones en genes homólogos en las cepas PAO1 y PA14 no reproducen los fenotipos observados para la cepa TB (281). De este modo, y teniendo en cuenta nuestros resultados y los de otros autores, podríamos concluir que es necesario el estudio de toda una batería de cepas de referencia para comprender en detalle las distintas formas de adaptación y de comportamiento de la bacteria en el medio que la rodea y que podrían ser relevantes para comprender su evolución tanto en un ambiente natural como en un ambiente clínico.

Hemos determinado que aproximadamente el 3% de los mutantes estudiados presentaban alteraciones en su fenotipo de sensibilidad a los antibióticos en comparación con su cepa silvestre. Ninguno de estos mutantes exhibía alteraciones drásticas en su crecimiento, de modo que estos cambios de sensibilidad se pueden atribuir a la interrupción de un gen determinado y no a la menor actividad de los antibióticos sobre bacterias de crecimiento lento (125).

Como podría esperarse, mutantes en los que la inserción del transposón se encuentra en genes de sistemas MDR tenían alterada su sensibilidad a los antibióticos. En nuestro caso la interrupción del gen PA1436 que codifica un posible miembro de un sistema de expulsión de drogas tipo RND provocaba que el mutante se hiciera más sensible a ciprofloxacino, imipenem y ceftazidima. Sorprendentemente, hemos detectado que la interrupción en un gen que codifica un transportador tipo MFS (PA2006), hace que la bacteria adquiera valores de CMI superiores que la cepa silvestre. Por otro lado, la inserción en otros dos componentes de dos sistemas MDR (PA2527: *muxB* y PA4598: *mexD*) provocaba cambios de sensibilidad variable según los antibióticos: para algunos la bacteria se hace más resistente y para otros más sensible. Podría parecer que la inactivación de un sistema MDR debería producir siempre un aumento en la sensibilidad a los antibióticos. Sin embargo, eso no es totalmente cierto. Se ha descrito que la pérdida de un sistema MDR puede compensarse con la sobreproducción de otro, lo que conllevaría un aumento en la resistencia como un efecto secundario (201). También se sabe que hay sistemas MDR, como MexGHI-OmpD (2), que intervienen en la señalización intercelular y su inactivación produce un aumento de la resistencia a los antibióticos como consecuencia de cambios en dicha señalización (101, 175).

Además de estos genes pertenecientes a sistemas MDR, hemos identificado 3 genes implicados en la biogénesis de la pared celular (PA1727: *mucR*, PA4367: *bifA*, PA3337: *rfaD*) y 21 genes catalogados como proteínas de membrana en los que la inserción del transposón alteraba la sensibilidad a los antibióticos de *P. aeruginosa*. Las proteínas de membrana externa son

moléculas fundamentales para la relación de la bacteria con el ambiente que la rodea, y se ha sugerido que estas proteínas pueden tener un papel en la resistencia intrínseca de la bacteria (89, 271, 386). Como se ha mencionado anteriormente, aunque los genes identificados no son en su mayoría iguales entre estos análisis y nuestro estudio, sí hay genes pertenecientes a las mismas categorías funcionales. Este es el caso de genes identificados en nuestro estudio como *mucR* (regulador de la síntesis de alginato) o *betA* (gen implicado en la síntesis de glicina-betaína). En otros estudios fueron identificados genes relacionados funcionalmente con los anteriores: *mucB*, cuya inactivación provoca que la bacteria adquiera un fenotipo mucoide (215) con más sensibilidad a los antibióticos (18); y BetT1, transportador de colina, precursor de glicina-betaína, e implicado en proteger a la bacteria frente al estrés osmótico (386).

Al igual que otros autores, hemos identificado genes relacionados con la transcripción, replicación y reparación del DNA como *uvrA* y PALES_27011 (*topA*). Es razonable que dentro de los posibles genes de resistencia y virulencia de una bacteria, además de proteínas de membrana y sistemas de expulsión de drogas, estén aquéllos que codifican proteínas de sistemas de reparación del ADN y respuesta a estrés. Se ha demostrado que *uvrA* es esencial en la adaptación de *Streptococcus* y *Lactobacillus* a pH ácido y estrés oxidativo (48, 140) y sus niveles se incrementan en *Mycobacterium* en respuesta a la fagocitosis (132). Otro gen que podría estar implicado en proteger a la bacteria del estrés oxidativo es PA5190, cuya interrupción produce un aumento en la sensibilidad a los antibióticos.

Hay que destacar que la mayoría de los mutantes seleccionados en nuestro estudio tienen alterada la sensibilidad a múltiples antibióticos y, por tanto, el desarrollo de la resistencia no es específico para cada antibiótico. La visión de que la resistencia intrínseca tiene un amplio grado de inespecificidad está apoyada por el hecho de que muchos de los productos codificados por estos genes están involucrados en funciones básicas de *P. aeruginosa* (Tabla 7). Esta ausencia de especificidad contrasta con la idea de que la actividad de que cada gen de resistencia se origina para impedir la actividad un antibiótico en particular (25). Junto con la idea de que los antibióticos no sólo son armas frente a competidores en la naturaleza, si no también moléculas señal (103, 204, 395), nuestros resultados sugieren que los genes de resistencia no son sólo barreras de protección, ofreciendo una visión más amplia de su papel fisiológico en las bacterias patógenas.

Como en otros estudios (37, 89, 312), la mayoría de los mutantes seleccionados en nuestro trabajo, exhibían una resistencia incrementada a los antibióticos (Figura 2) y el 18% de ellos eran más resistentes a todos los antibióticos utilizados. Las proteínas involucradas incluyen proteínas de membrana externa y transportadores (conocidos o hipotéticos) tales como OmpA, CzcC, PA0809, PA2760 y PA4691. Estas proteínas sirven probablemente para transportar antibióticos al citoplasma celular o, si pertenecen a sistemas MDR, a expulsarlos y podrían, por tanto, dar lugar a fenómenos de resistencia debidos a la impermeabilidad frente a los antibióticos.

Otras mutaciones que reducen la sensibilidad a todos los antibióticos están en genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo celular básico tales como *rafDI*, que codifica ADP-L-glicero-D-manoheptosa-6-epimerasa, y *gapA*, que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Las bacterias con un crecimiento más lento son normalmente menos sensibles a los antibióticos (199). Debido a que en medio rico no se han observado fuertes diferencias de crecimiento entre los mutantes, ciertas características del metabolismo bacteriano independientes del crecimiento deben ser responsables de los cambios observados en la sensibilidad a los antibióticos. Esto acentúa el hecho de que la sensibilidad a los antibióticos probablemente dependa del estado metabólico de la bacteria (149, 383). Así, además de los conocidos mecanismos específicos de resistencia, la bacteria tendría un resistoma “dependiente de fisiología”. Durante la infección la bacteria detecta las características de su ambiente y altera su

metabolismo en consecuencia. Por tanto, el conocimiento acerca de los cambios que ocurren en las redes metabólicas durante la infección pueden ayudarnos a mejorar los tratamientos, especialmente en localizaciones en el cuerpo humano donde la cantidad de antibiótico libre no es muy elevada. El hecho de que mutaciones tanto en regiones intergénicas como en proteínas reguladoras y sistemas sensores afecte la sensibilidad de la bacteria también apoya el concepto de que la sensibilidad *in vivo* puede ser dependiente del estado fisiológico en respuesta a las señales recibidas durante la infección (220).

Un fenotipo que se repite en diversos mutantes es el incremento de la sensibilidad a imipenem acompañado del descenso de la sensibilidad a ceftazidima. Los genes interrumpidos pertenecen a diferentes categorías funcionales: sensor-regulador de dos componentes, genes implicados en quimiotaxis, reguladores transcripcionales y genes relacionados con el metabolismo de lípidos. A pesar de que no hemos podido establecer una conexión entre las funciones de estos genes y su fenotipo de mayor sensibilidad a carbapenemas y menor a cefalosporinas, este resultado ofrece una base teórica para explorar la posibilidad de utilizar terapias alternas con imipenem y ceftazidima para el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa*. A lo largo de nuestro trabajo, encontramos que el desarrollo de un fenotipo de resistencia intrínseco en *P. aeruginosa* requiere la acción concertada de diversos genes que codifican funciones básicas de la fisiología celular. Nuestros resultados apoyan la idea de que la resistencia intrínseca, y la capacidad para adquirir unos niveles mayores de resistencia pueden ser la consecuencia de una compleja red de interacciones entre diferentes proteínas bacterianas. Esto abre un nuevo campo de investigación de predicción de resistencia (219) en poblaciones bacterianas. Habitualmente, la búsqueda de mecanismos de resistencia se dirige, bien a mutaciones en los blancos de acción de los antibióticos, bien a determinantes homólogos a los descritos hasta el momento. Nuestro estudio (102), y los de otros autores (37, 89, 312) indican que hay todavía genes de resistencia desconocidos, como los aquí expuestos, que no se tienen en cuenta a la hora de estudiar las bases moleculares de la resistencia de *P. aeruginosa*.

Nuestro análisis no sólo permite identificar nuevos determinantes genéticos de resistencia en *P. aeruginosa* frente a un compuesto determinado si no también identificar genes cuya inactivación sensibiliza a la bacteria frente a varios antibióticos. Los productos de estos genes son potenciales dianas cuya inactivación aumenta la sensibilidad de la bacteria y podrían ser la base del desarrollo de drogas que potenciaran los antimicrobianos existentes. Ejemplos de estas combinaciones antibióticas son beta-lactámicos con un inhibidor de beta-lactamasas (196). Esta combinación entre un antimicrobiano y un inhibidor del sistema de resistencia es efectiva porque disminuye la concentración del antibiótico requerido para la terapia y porque permite el tratamiento de infecciones por bacterias que, en ausencia del inhibidor, serían resistentes. Por tanto, nuestros resultados permiten la identificación de posibles dianas para el desarrollo de nuevos antibacterianos, utilizando esta aproximación anti-resistencia.

5.2 Análisis de la citotoxicidad de mutantes de *P. aeruginosa* con sensibilidad a los antibióticos alterada

Durante la infección, la bacteria tiene que hacer frente a diferentes ambientes, por tanto, la adaptación fenotípica a todos ellos es importante para que la bacteria tenga un crecimiento eficaz y desarrolle dicha infección. Dado que la expresión constitutiva de factores de virulencia puede tener un coste energético para la bacteria, cabe pensar que dicha expresión esté regulada por señales existentes en el punto de infección. Como se ha indicado anteriormente, en el paciente tratado, una bacteria necesita ser simultáneamente resistente a los antibióticos y virulenta para desarrollar una infección eficaz (217). Dado que, como se ha detallado en la Introducción, la resistencia a los antibióticos puede producir cambios en la virulencia bacteriana, cabe la posibilidad de que existan redes de regulación (y eventualmente señalización) que conecten

ambos fenómenos. El análisis de dichas redes, como se plantea en este trabajo, ofrece un punto de vista radicalmente nuevo al estudio de la patogénesis bacteriana .

Para analizar esta posible interconexión, hemos buscado genes implicados simultáneamente en la resistencia a los antibióticos y la virulencia bacteriana. Para ello, analizamos la citotoxicidad como marcador de virulencia en los mutantes con cambios en sensibilidad a los antibióticos previamente seleccionados. Un 51% de un total de 222 mutantes con cambios en la sensibilidad a los antibióticos presentaron variaciones en citotoxicidad, indicando que efectivamente la resistencia a los antibióticos y la virulencia bacteriana están interconectadas. Esto no quiere decir que la correlación sea directa. Entre los mutantes menos sensibles a los antibióticos que hemos seleccionado, hay algunos que son más citotóxicos, otros que lo son menos y hay algunos que no presentan cambios en sus niveles de citotoxicidad, e igualmente ocurre para los mutantes hipersensibles. Estos datos nos indican por tanto que la adquisición de resistencia no va siempre asociada a una disminución de la virulencia (*fitness cost*), sino que dicha virulencia puede ser incluso mayor, indicando por tanto que los efectos de la resistencia son bastante específicos y dependientes del tipo de mecanismo implicado.

Como muchas otras bacterias Gram-negativas, *P. aeruginosa* interacciona directamente con las células eucariotas mediante el T3SS (157). Este sistema, como se ha mencionado anteriormente, forma una compleja maquinaria en la superficie de la bacteria, cuya función, altamente regulada, es la de transportar proteínas directamente en el interior de la célula eucariota (109). En el caso de *P. aeruginosa*, el T3SS está implicado directamente en la citotoxicidad sobre células eucariotas. Para corroborar los resultados obtenidos en la línea celular de macrófagos medimos la T3SS de los mutantes con cambios simultáneos en citotoxicidad y sensibilidad a los antibióticos. En más de un 85% de los mutantes, el aumento de la citotoxicidad medida en la línea celular de macrófagos se correlacionaba con un aumento de la T3SS, y viceversa. Sin embargo, un pequeño número de mutantes no presentaban cambios en el mismo sentido en citotoxicidad y T3SS. Para explicar esta pequeña discordancia, caben distintas posibilidades. Hay que señalar, que en este sistema de secreción el papel del aparato de translocación puede no estar limitado a transportar las proteínas efectoras (a las que se les ha atribuido clásicamente la toxicidad de este sistema). El poro de translocación, por sí mismo es suficiente para causar la muerte del hospedador (66, 130, 197, 358). La muerte podría ser causada, bien directamente, debido a un incremento de la permeabilidad de la membrana plasmática (66, 130, 197, 318), bien indirectamente, a través de la activación de respuestas celulares del hospedador de tipo pro-inflamatorio, que conduzcan a la apoptosis o a la necrosis, como se ha observado en otros patógenos (295). Por otro lado, se sabe que condiciones metabólicamente desfavorables, pueden reducir los niveles de secreción ya que pueden impedir el ensamblaje correcto de la maquinaria del T3SS en la superficie de la bacteria (288). De este modo, mutaciones en genes que induzcan un estrés metabólico en la bacteria modularían la capacidad de secreción de efectores y la correcta disposición del aparato translocador de los mismos. Por otro lado, está demostrado que la localización adecuada de los efectores dentro de la célula hospedadora es esencial para la modificación eficiente de sus sustratos (287, 399). De este modo, una mutación que produzca una disminución en las proteínas efectoras pero no en las que forman el poro en la membrana plasmática, aquellas que produzcan una localización errónea de proteínas efectoras o un ensamblaje incorrecto de las proteínas del poro, o aquellas que desestabilicen el metabolismo bacteriano pueden llevar a que un aumento de la secreción no implique necesariamente un aumento de la citotoxicidad en los macrófagos y viceversa.

Por otro lado, aparte de la T3S las bacterias usan una variedad de factores de virulencia para manipular las células hospedadoras, causando daños en las mismas. Han sido diversos los trabajos que han permitido caracterizar unas estructuras denominadas *Outer Membrane Vesicles* (OMV) y se han descrito como un mecanismo mediante el cual las bacterias, incluyendo *P.*

aeruginosa (180, 222), pueden secretar múltiples factores de virulencia de forma simultánea en el citoplasma de la célula eucariota, mediante la fusión de estas OMV con la bicapa lipídica de la membrana plasmática de la célula hospedadora, sin necesidad del contacto directo del patógeno con la célula huésped para causar citotoxicidad (165-167, 252).

P. aeruginosa es, asimismo, capaz de secretar otra toxina con efectos citotóxicos independientemente del T3SS: ramnolípidos. Los ramnolípidos fueron identificados en un primer momento como la hemolisina termoestable de este patógeno (112, 162, 163). También se propuso su papel como solubilizante de los fosfolípidos del surfactante pulmonar, haciéndolos más accesibles a la acción de la fosfolipasa C (184). Posteriormente, se ha visto que tienen diversos efectos en las células de mamíferos como de interrumpir la respuesta quimiotáctica de neutrófilos o inhibir la función normal de los macrófagos (229). También se les ha atribuido un papel en la formación del *biofilm* (84, 174) y en la motilidad tipo *swarming* de la bacteria (84).

Al analizar los genes con un papel simultáneo en resistencia y virulencia se identificaron genes previamente identificados como factores de virulencia en *P. aeruginosa* como PA3319 (fosfolipasa C no hemolítica) (331) o PA3551 (*algA*, gen implicado en la biosíntesis de alginato) (225, 323). Genes relacionados con la síntesis de alginato e identificados en nuestro estudio son *kinB* (68, 209) y *mucR* (142, 181), como se detalla en Resultados. Además de estos determinantes de patogenicidad clásicos, se identificaron en nuestro estudio otros genes relacionados con virulencia. Este es el caso del gen PA0071, que se encuentra dentro de la Isla de Patogenicidad que codifica el Sistema de Secreción Tipo VI de *P. aeruginosa* (246). Otro de nuestros genes (PA1410), codifica una proteína que pertenece a un sistema de transporte de espermidina/putrescina con un 78% de homología con la proteína PotF1 de *E. coli*. Se ha determinado que una mutación en el sistema de captura de espermidina *spuDEFGH* (que presenta más de un 70% de similitud con las proteínas PotF de *E. coli*), inhibe la expresión del operón *exsCEBA* (400). En nuestro estudio también se identificó una secuencia con un 100% de identidad con la proteína PALES_27011 de *P. aeruginosa* LESB58. Este gen codifica una DNA topoisomerasa III. En un estudio de identificación de genes inducidos *in vivo* en infección por *L. monocytogenes*, se determinó en una región homóloga al gen de la topoisomerasa III de *B. subtilis* (116). Alteraciones del superenrollamiento del DNA se han asociado con la regulación de la expresión de genes de virulencia en *Shigella flexneri* (88). Otros genes relacionados con virulencia son los implicados en la síntesis de ácido cianhídrico, una potente toxina implicada en la toxicidad de *P. aeruginosa* (40, 118). Uno de estos genes fue identificado también en nuestro estudio *hcnB*. Otros de los genes identificados en nuestro estudio es *gbdR*. Recientemente se ha descrito la capacidad de GbdR de regular la transcripción de *plcH* (366). Este gen codifica la fosfolipasa C hemolítica de *P. aeruginosa* capaz de degradar fosfatidilcolina y esfingomiélinas en las membranas celulares de las células eucariotas al igual que la fosfatidilcolina extracelular surfactante del pulmón (27). Numerosos estudios han implicado a PlcH con la virulencia de *P. aeruginosa* en distintos modelos animales (377) y en plantas (280). Otro de los genes de nuestro estudio es PA0809 que codifica un posible transportador de iones metálicos de la familia NRAMP. Se ha apuntado que estos transportadores puedan tener un papel en la protección de *S. typhimurium* frente a especies reactivas de oxígeno y en patogénesis (170).

Otro ejemplo de regulación cruzada entre resistencia y virulencia, identificado en nuestro estudio, es la porina OprQ. Esta proteína pertenece a la misma familia que OprD, que es un transportador de amino ácidos básicos cuya mutación es frecuente en aislados con resistencia a imipenem (161). Por otro lado, OprQ se ha visto que puede estar implicada en la virulencia de la especie *P. fluorescens* (284).

Por tanto, nuestros datos indican que el fenotipo de virulencia y resistencia a los antibióticos de *P. aeruginosa* implica una compleja red de elementos que incluyen genes no clásicos de resistencia y virulencia que eran desconocidos hasta ahora.

Como hemos mencionado repetidamente en este trabajo, además de la citotoxicidad, la virulencia de *P. aeruginosa* depende de otros factores, muchos de ellos regulados por QS (190, 316, 359, 363). El análisis de los resultados derivados del estudio de estos determinantes de patogenicidad se muestra en el siguiente apartado.

5.3 Análisis de factores de virulencia regulados por el Sistema de Quórum-Sensing en mutantes con cambios simultáneos en sensibilidad a los antibióticos y virulencia

El sistema de QS es fundamental en la patogénesis de las infecciones producidas por *P. aeruginosa* (46, 47, 55, 277, 344, 346) y controla de modo coordinado la expresión de factores de virulencia en el pulmón de pacientes de fibrosis quística (30, 382). Por esta razón decidimos estudiar la producción de distintos factores de virulencia regulados por este sistema en el grupo de mutantes previamente seleccionados que presentaban cambios simultáneos en sensibilidad a los antibióticos y citotoxicidad. En estos análisis se midió la producción de pioverdina, piocianina, exoproteasas (elastasa y caseinasa) y la formación de *biofilms*. Asimismo, y debido a que la motilidad es importante para la colonización del huésped por parte de *P. aeruginosa*, se midió dicha motilidad en estos mutantes.

En la genoteca generada en la cepa 59.20 la mayoría de los mutantes presentaba una disminución de la sensibilidad a los antibióticos que estaba correlacionada con una menor producción de exoproteasas y una mayor citotoxicidad. Por otro lado, los mutantes que presentan un aumento en la producción de factores de virulencia son en su mayoría más sensibles que la estirpe silvestre. Por el contrario, en la genoteca obtenida en la cepa silvestre TB, los mutantes con una sensibilidad mayor a ciprofloxacina, imipenem y ceftazidima presentaban una disminución en la producción de factores de virulencia y unos valores de citotoxicidad más reducidos que su isogénica silvestre, lo que vuelve a indicar que un fenotipo de mayor resistencia a los antibióticos no tiene que estar forzosamente asociado a una menor virulencia.

Se ha descrito que las cepas de *P. aeruginosa* que provienen de enfermos con infecciones pulmonares crónicas tienen defectos en T3S y, además, producen más *biofilm* que las implicadas en infección aguda (186, 325, 396). Esto ha llevado a afirmar que los elementos requeridos por *P. aeruginosa* para causar infecciones crónicas y agudas son diferentes. Una posibilidad para explicar esta regulación inversa de la producción de factores de virulencia puede ser la respuesta QS. Los datos publicados hasta el momento son contradictorios. Linares y cols. afirman que la T3S no está regulada por QS (205), mientras que Bleves y cols. indican que el sistema QS controla negativamente el T3SS a través de la ruta de señalización RhII-RhIR (34). Sorprendentemente, en este estudio el operón *exsCBA*, que codifica ExsA, el activador general del T3SS no está negativamente regulado por el sistema QS, ya que la actividad del promotor del gen *exsC* no se afectaba ni por un mutante en *lasR* ni en *rhII*, indicando que el efecto es independiente de ExsA.

Dentro de nuestro estudio, uno de los genes identificados es *pqsB*, que forma parte del operón de síntesis de la molécula de QS, PQS (119). En este caso, los niveles de T3S del mutante no aumentan con respecto a los de su isogénica silvestre TB, aunque sí se observan una reducción en la expresión de factores de virulencia regulados por QS como elastasa, *biofilms*, piocianina y pioverdina. En este caso no hay una regulación negativa entre el sistema QS y la T3S, de acuerdo con los datos publicados por nuestro laboratorio previamente (205). Una de las posibilidades para explicar esta discrepancia es que, tanto nuestros ensayos, como los de Linares

y cols., miden la T3S a tiempo final, mientras que en el estudio de Bleves y cols. se estudia la cinética del T3SS. Cuando en este estudio se compara la T3S a tiempo final, las concentraciones extracelulares de ExoS son las mismas, tanto en la cepa silvestre como en el mutante *rhII*, lo que indica que el sistema QS sólo afecta a la cinética de la T3S y no su actividad final.

Más recientemente, se ha descrito una cascada de señales, mediada por ARNs de pequeño tamaño, que regula de modo inverso la formación de *biofilms* y la expresión del T3SS. El sensor híbrido RetS activa T3SS y reprime la formación de *biofilms*, induciendo la colonización/diseminación de la bacteria en modelos de infección aguda en ratón (129, 189, 401). Los genes que están bajo el control de RetS están inversamente regulados por otros dos sensores quinasa: LadS y GacS. Se ha demostrado que la actividad reguladora de RetS está canalizada a través del sistema de dos componentes GacA-GacS. Análogamente a lo que sucede en el sistema BarA/UvrY en *E. coli*, el sensor quinasa GacS podría fosforilar GacA, de modo que empezaría la señalización a través de este sistema (188). GacA fosforilado activa la transcripción de dos RNAs pequeños, RsmZ y RsmY, que son antagonistas del regulador traduccional RsmA. RsmA se une específicamente a ARNm dianas, estabilizando unos e induciendo la degradación de otros. Además de GacS, otro sensor quinasa LadS, es un activador de la expresión de RsmZ y RsmY. Para la función de RetS se requiere tanto a GacA como a GacS (360).

Nuestros datos indican, sin embargo, que hay otras redes de regulación modulando la expresión de estos elementos. Así, mientras que en la genoteca TB algunas de las mutaciones que provocan una disminución en la capacidad de formación de *biofilms* de la bacteria aumentan los niveles de secreción de proteínas del T3SS, en la genoteca 59.20, son pocas las mutaciones que provocan una disminución de la formación de *biofilms*, y además no todas están relacionadas con un aumento del T3SS. Este resultado está de acuerdo con trabajos recientes que indican que la T3S y la producción de *biofilms* no son excluyentes (239). En este trabajo se muestra que diversos factores de virulencia regulados por QS, como pili tipo IV, ácido cianhídrico y los pili tipo IV se expresan altamente en células creciendo en *biofilms*. Igualmente, demuestran que 21 genes involucrados en T3S están expresados a alto nivel en estos *biofilms* y detectan tanto proteínas del poro, PcrV, como proteínas efectoras, ExoT y ExoS. Se ha descrito además que la formación de los *biofilms* frente a la expresión de genes del T3SS es como una “elección de estilo de vida” de la bacteria representando dos caminos que conducen a la infección crónica o a la aguda (115, 129, 389). Se ha sugerido que el T3SS impide la formación de los *biofilms* (178). Sin embargo, las infecciones crónicas no van necesariamente acompañadas de la formación de *biofilms* (392), y los *biofilms* se han asociado a ciertas infecciones agudas (309). En conclusión, nuestros datos junto con los de otros grupos ponen de manifiesto que la T3SS y la formación de *biofilms* no son dos procesos excluyentes, indicando por tanto que existen redes de regulación superpuestas a las descritas hasta este momento.

Como se ha mencionado en diferentes ocasiones a lo largo de este trabajo, la motilidad está fuertemente asociada con la patogénesis de *P. aeruginosa* (14), al permitir a la bacteria colonizar diferentes ambientes, adherirse a superficies y formar *biofilms* (260). *P. aeruginosa* es capaz de llevar a cabo cuatro tipos de motilidad: *twitching*, *swimming*, *swarming* (283) y *sliding* (249).

En la genoteca 59.20, más del 50% de los mutantes presentan una disminución simultánea en motilidad tipo *swimming* y *swarming* (Tabla 9). La alteración simultánea de la motilidad tipo *swimming* y la motilidad tipo *swarming* está de acuerdo con que ambos tipos de movimientos están mediados por el flagelo (174). Entre los genes identificados con cambios en motilidad se encuentra PA1727, que codifica MucR. Esta proteína reguladora está implicada en transducción de señales en procesos de motilidad y adherencia a superficies (142). Otros genes identificados en nuestro estudio tienen una relación indirecta con motilidad. PA5208 que codifica

una proteína de función desconocida (posible regulador transcripcional), también fue identificado en un análisis de búsqueda de mutantes defectivos en motilidad tipo *swarming* (266). En este mismo estudio se identificaron proteínas de los operones *xcp*, *pil* y *alg*. Tres de sus representantes *xcpY*, *pilW* y *algA* también aparecieron en nuestro análisis. En el estudio de Overhage y cols., aparecen proteínas relacionadas con el sistema *rhl* de QS. En nuestro análisis identificamos el gen *pqsB*. El resto de genes pertenecen a categorías funcionales variadas, y el grupo más numeroso son las proteínas implicadas en el metabolismo bacteriano.

En la genoteca TB, la mayor parte de los mutantes no presentan cambios en motilidad con respecto a la cepa silvestre o muestran variaciones en un solo tipo de movimiento. Como se ha mencionado anteriormente, la cepa TB proviene de un aislado clínico de un paciente de FQ y presenta una mutación que interrumpe el marco de lectura en el gen *pilQ*, lo que provoca que esta cepa carezca de pili tipo IV (353). De este modo, la estirpe silvestre TB presenta defectos en los tipos de motilidad que dependen de esta estructura, como son *twitching* y *swarming*. Por ello, los mutantes que tienen afectado estos dos tipos de movimiento muestran todos un aumento de motilidad. Algunas de las mutaciones que son capaces de recuperar la motilidad de *P. aeruginosa* están en genes relacionados con sistemas de regulación de la expresión génica incluyendo reguladores transcripcionales (*PA2591* y *PA5208*) *topA* (que codifica una DNA topoisomerasa de clase III) o *wspE* (que codifica una proteína que forma parte de un sensor regulador). Entre los genes identificados en la genoteca TB de los que previamente se ha visto una implicación en motilidad, identificamos al gen *PA3704*. La proteína codificada por este gen, WspE, forma parte de un sistema sensor/efector implicado entre otros eventos en la formación de *biofilms* mediante la regulación de los niveles intracelulares de diGMPc (146). La inserción del transposón en el gen *PA3704* provoca un aumento de la motilidad tipo *swarming* y tipo *twitching*, así como una ligera disminución en el movimiento tipo *swimming*. Otro de los genes de nuestro análisis es *uvrA*, involucrado en fenómenos de reparación del ADN, que también se ha encontrado implicado en la motilidad tipo *swarming* en estudios anteriores por mecanismos que se desconocen (266).

La motilidad tipo *swarming* es un fenómeno que caracterizado por un movimiento rápido coordinado de la bacteria a lo largo de una superficie semi-sólida (174). Las células capaces de llevar a cabo este tipo de movimiento son hiperflageladas y más largas comparadas con las células vegetativas que son más cortas y uni-flageladas (110). *P. aeruginosa* requiere de los flagelos y posiblemente de los pili tipo IV para llevar a cabo este tipo de movimiento (174). También son necesarios biosurfactantes como los ramnolípidos (44, 350). La dependencia de estos biosurfactantes sugiere que el sistema QS de la bacteria juega un papel importante en este tipo de propagación celular, ya que este sistema controla la producción de ramnolípidos (356). Además de los cambios físicos tales como la elongación celular, se ha descrito que estas células sobreexpresan diversos factores de virulencia incluyendo los relacionados con la T3SS (265). En nuestro estudio, en la genoteca 59.20 no se observa esta relación entre T3SS y motilidad tipo *swarming*. Sin embargo, sí se observa una relación entre cambios en la secreción de factores de virulencia y motilidad. En la Figura 13, los genes agrupados en malva, cuya mutación produce un aumento de los niveles de secreción de factores regulados por QS (especialmente, caseinasa, elastasa, pioverdina y piocina) presentan también un aumento en su motilidad (Tabla 9). De igual forma los genes agrupados en azul en esta misma Figura presentan una disminución de la secreción de factores de virulencia que va acompañada de un descenso en la motilidad de los mutantes (Tabla 9). Por otro lado, en la genoteca TB, aproximadamente el 41% de los mutantes que aumentan la T3SS presentan también mayor movimiento tipo *swarming* que su cepa silvestre.

Por otro lado, se ha descrito que las bacterias que son capaces de hacer *swarming* exhiben niveles elevados de resistencia adaptativa a diferentes antibióticos tales como ciprofloxacino, gentamicina y polimixina B (265). En nuestro estudio, por el contrario, en la genoteca 59.20, las mutaciones que provocan una disminución de la sensibilidad a la totalidad de

los antibióticos (agrupados en azul en la Figura 13) provoca en su mayoría defectos en *swimming* y *swarming*. En cambio, en la genoteca TB, sí observamos que los mutantes menos sensibles a polimixina B o a ciprofloxacino son, en su mayoría, más móviles que su cepa silvestre. Se ha indicado que, además de una forma de locomoción, el movimiento tipo *swarming* es parte de un estado de crecimiento alternativo de *P. aeruginosa* y es un proceso complejo de adaptación en respuesta a estímulos ambientales específicos que producen cambios en virulencia, expresión génica, resistencia a los antibióticos y posiblemente metabolismo (265). Nuestros resultados están de acuerdo con esta posibilidad e indican además que el efecto es posiblemente diferente en distintas estirpes, dado que las asociaciones entre *swarming* y resistencia a los antibióticos son claramente diferentes en las estirpes 59.20 y TB.

Un estudio reciente usando una genoteca de *P. aeruginosa* PAO1 (200) identificó 36 mutantes con fenotipo alterado en motilidad tipo *swarming* (266). Además, la comparación de la expresión génica de las células creciendo en *swarming* o creciendo en medio idéntico pero en agitación, mostraban un cambio en un 7,5% de todos los genes de *P. aeruginosa*. De los 417 genes que estaban regulados diferencialmente en células creciendo en *swarming* se incluían 18 reguladores transcripcionales. En nuestro estudio identificamos 5 reguladores transcripcionales o proteínas hipotéticas a las que se les asocia esta función (*PA1738*, *PA4806*, *PA1727*, *PA2591*, *PA5208*). Además, dentro de los genes en los que la inserción del transposón provocaba cambios en la motilidad de *P. aeruginosa* identificamos genes que funcionan en procesos tan diversos como transporte, secreción y metabolismo, sugiriendo que la regulación de la motilidad es un fenómeno muy complejo.

En estudios sobre cambios en motilidad tipo *swarming* y capacidad de formación de *biofilms* en la cepa de *P. aeruginosa* PA14, se encontró una relación inversa entre ambos fenómenos (44, 236). En un trabajo reciente de análisis de una genoteca de PA14 buscando mutantes en *swarming*, la mayoría de los mutantes que no hacen *swarming* tienen inserciones del transposón en reguladores transcripcionales que muestran un fuerte incremento en la formación de *biofilms* (394). En contraste, se ha observado que un mutante en *gacA* que presenta una mayor motilidad tipo *swarming* es deficiente en la formación de *biofilms* (267). En el análisis efectuado en las genotecas TB y 59.20, en algunos mutantes sí se observa esta regulación inversa entre formación de *biofilms* y motilidad tipo *swarming*, pero no de una forma clara en todos ellos. Es importante tener en cuenta que se ha propuesto que el *swarming* puede estar involucrado en las etapas iniciales de la formación de *biofilms*, de modo que células activas en movimiento de *swarming* forman *biofilms* planos y células deficientes en *swarming* forman *biofilms* estructurados (324). En un estudio realizado en una genoteca de inserción en la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* no se establece tampoco esta relación inversa entre *swarming* y *biofilm* (266). Estas diferencias entre unos análisis y otros pueden derivar tanto de los distintos métodos y condiciones de cultivo de las bacterias que se utilizan para la medida de formación de *biofilms* como del uso de diferentes estirpes bacterianas.

Otros dos fenómenos que parecen estar regulados de forma inversa son la T3S y el ensamblaje del flagelo en *P. aeruginosa* (332). La expresión opuesta de los sistemas flagelares y el T3SS en *P. aeruginosa* se ha observado también en aislados SCV (*Small Colony Variants*) de pulmones de pacientes con fibrosis quística (362), que además presentaban un incremento de la capacidad para formar *biofilms*, una citotoxicidad y virulencia aumentada (indicando nuevamente que estos dos fenotipos no siempre tienen una regulación inversa), y una habilidad reducida para la motilidad tipo *swimming*, que es dependiente de flagelo. En nuestro estudio, en la genoteca 59.20, sí se observa una relación inversa entre el T3SS (y citotoxicidad) (Tabla 9 y Figura 13) y la motilidad tipo *swimming*. Sin embargo, a diferencia de lo que se observa en los aislados de pulmones de pacientes FQ, los mutantes defectivos en *swimming* no tienen grandes cambios en la formación de *biofilms* y los niveles de proteasas lejos de aumentar son significativamente

menores que su cepa silvestre. En la genoteca TB, algunos mutantes con defectos en *swimming* tienen unos niveles de T3S y citotoxicidad superiores a los de la cepa silvestre. El solapamiento directo entre los mecanismos de regulación que controlan la expresión génica del sistema flagelar y del T3SS es un proceso conservado en otras bacterias Gram-negativas. De hecho, esta regulación cruzada que se observa en *P. aeruginosa* es similar a la que se produce entre los reguladores globales del sistema flagelar y el T3SS de *Y. Enterocolitica* (33, 379). De forma contraria, en *S. enterica serovar Typhi*, las mutaciones en genes que codifican proteínas reguladoras flagelares reducen significativamente la expresión del regulón SPI-1 y la secreción de efectores, sugiriendo en este caso una regulación cruzada positiva entre ambos fenómenos (95).

En conclusión, los genes asociados a motilidad se encuentran en la mayoría de las categorías funcionales descritas para *P. aeruginosa* PAO1. La implicación de reguladores involucrados en procesos de locomoción de la bacteria proporciona un apoyo para pensar que este fenómeno está altamente regulado. Nuestro estudio revela también que se solapa con otros eventos complejos de adaptación tales como *biofilm*, QS y cambios en la sensibilidad a los antibióticos.

Como ejemplo de los distintos niveles en los que puede operar la interconexión entre la resistencia y la virulencia de *P. aeruginosa*, hemos estudiado con algo más detalle cuatro mutantes que inactivaban genes de distintas categorías funcionales. *PA4112* codifica un posible híbrido sensor/regulador de respuesta y no se preveía que pudiera estar directamente involucrado en resistencia, *PA2527* codifica un posible miembro de una bomba MDR de modo que podría estar implicado en resistencia y en QS (comunicación bacteriana), *PA5542* codifica una posible β -lactamasa y por tanto se enmarcaría dentro de los genes clásicos de resistencia y *PA3704* codifica un miembro de un sistema sensor que regula la formación de *biofilms*, y por tanto, indirectamente, regula la resistencia a los antibióticos.

5.4 Análisis de un posible sistema regulador de dos componentes implicado simultáneamente en resistencia a los antibióticos y virulencia en *P. aeruginosa*

El gen *PA4112* codifica una proteína a la que se le asigna una posible función como híbrido sensor regulador de respuesta (337) y presenta una similitud de un 52% con una histidina quinasa de *Synechocystis sp* (168). La supervivencia de la bacteria bajo condiciones cambiantes del ambiente requiere la capacidad de captar y responder rápidamente a diferentes estímulos. Los sistemas de dos componentes, permiten al microorganismo actuar de una forma rápida y apropiada dando una respuesta fisiológica que puede implicar la transcripción alterada de numerosos genes. Los sistemas reguladores de dos componentes comprenden una histidina quinasa sensora localizada en la membrana interna de la bacteria y un regulador de respuesta situado en el citoplasma (336). El modo de funcionar de ambas proteínas está determinado por unas reacciones reversibles de transferencias de grupos fosfatos y cambios conformacionales de las proteínas (336). Existe un tipo de sensor quinasa no ortodoxo, que contiene un dominio Hpt fusionado al dominio receptor N-terminal y se piensa que participan en redes complejas de transferencia de fosfato. Este sistema puede proporcionar una flexibilidad añadida relativa a la transducción de señales mediada por el sistema clásico (291). La proteína *PA4112* pertenece al grupo de sensores híbridos “no ortodoxos”, al que pertenecen otros sensores como *GacS* (38, 75, 280) y *SadS* (118, 178, 183).

En los análisis de citotoxicidad y virulencia, cuando se expresa el gen desde un promotor heterólogo en el mutante de inserción AF06, la expresión del gen *PA4112* complementa parcialmente, la mutación producida por la inserción del transposón. Igualmente, la delección del gen *PA4112* en la cepa PAO1 sólo reproduce el fenotipo de inserción para un antibiótico (imipenem) y para algunos factores de virulencia. Estas diferencias observadas pueden ser

debidas a que el mutante de inserción y delección pertenecen a dos cepas distintas de *P. aeruginosa* o a que la mutación introducida por la inserción podría provocar la síntesis de una proteína incompleta que tuviera una actividad distinta a la de la proteína nativa, o bien produjera una activación constitutiva del regulador. Se han descrito algunas mutaciones en la parte sensora del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ, en las que un mutante en *phoQ* presenta un fenotipo de alta resistencia a polimixina y a péptidos antimicrobianos tanto en condiciones de no inducción como inducción. En un sistema nativo, en condiciones de no inducción con alto magnesio, *phoQ* defosforila a *phoP* inactivándolo, y por el contrario, en el mutante en *phoQ* esta inactivación se pierde, de modo que la parte reguladora del sistema se encuentra continuamente activa (232, 233). Igualmente se produce en algunas mutaciones en el sistema PmrB/PmrA donde algunas mutaciones en *pmrB* provocan un estado constitutivo activado de *pmrA* (245).

Ya que los sistemas de dos componentes son mecanismos para que la bacteria se adapte al ambiente y los MDR participan en dicha adaptación, es razonable pensar que algunos sistemas de dos componentes puedan controlar genes de transporte de drogas. En *E. coli* está descritos dos sistemas reguladores, *evgSA* y *BaeRS*, adyacentes a los operones de sistemas MDR *EmrKY* y *MdtABC*, respectivamente. La sobreexpresión de estos dos sistemas reguladores confiere a la bacteria una resistencia múltiple a drogas mediada por estos sistemas MDR (21, 94). En el caso del gen *PA4112*, su gen adyacente, *PA4113*, codifica un posible sistema MDR del tipo MFS. No hemos medido los niveles de expresión de este sistema, pero el aumento de la resistencia múltiple a los antibióticos observado podría deberse a una activación constitutiva de la parte reguladora del sensor híbrido, que a su vez indujera una activación permanente de ésta o de otra bomba.

Como se ha mencionado anteriormente, el gen *PA4112* codifica un sensor-regulador híbrido no ortodoxo, como *gacS* o *retS*. Estudios recientes sugieren que *P. aeruginosa* coordina la actividades de múltiples sensores quinasas de dos componentes como un modo de regular de forma recíproca genes involucrados en la infección aguda y crónica. El funcionamiento de este sistema se ha detallado en el apartado 3 de la Discusión. Los cambios observados en el mutante de inserción, con un aumento en la expresión de factores de virulencia propios de infección aguda (exoproteasas, piocinina y pioverdina) y una ligera disminución de factores de virulencia propios de infección crónica (biofilms) nos llevan a pensar que *PA4112*, que tiene dominios homólogos a *RetS* y *GacS* podría intervenir de forma directa o indirecta en el balance de RNAs pequeños que regulan inversamente la expresión de genes involucrados en infección aguda y crónica.

5.5 Análisis de una nueva betalactamasa de *P. aeruginosa* implicada en la virulencia y la resistencia de esta bacteria

La inserción del transposón en el gen *PA5542*, provoca un aumento de la sensibilidad del mutante a antibióticos del grupo de los betalactámicos. Este fenotipo estaba de acuerdo con la predicción informática del gen, al que se le asignaba una posible actividad betalactamasa en base a un dominio conservado del tipo betalactamasa o dominio tipo PBPs (*Penicilin Binding Protein*) (337). En los ensayos de CMIs y mediante la medida de la actividad imipenemasa de la bacteria podemos confirmar que la proteína *PA5542* es capaz de hidrolizar antibióticos de la familia de los carbapenemas.

Por otro lado, la citotoxicidad y la T3S del mutante de inserción y delección son menores que en sus cepas isogénicas correspondientes. Igualmente, la secreción de factores de virulencia y la capacidad de movimiento del mutante están alteradas. Hay que tener en cuenta que en la envuelta celular de *P. aeruginosa* se encuentran anclados una gran variedad de complejos multiproteicos entre los que se incluyen flagelos, pili, sistemas de secreción y bombas de expulsión que deben ensamblarse correctamente para impedir la destrucción de la integridad

estructural del peptidoglicano. Igualmente, perturbaciones en el proceso de síntesis o remodelación del peptidoglicano podrían perjudicar fenotipos importantes relacionados con la virulencia de esta bacteria. Es importante destacar que las PBPs participan en los procesos de transglicosilación y transpeptidación del peptidoglicano (338, 349) y que la betalactamasa *ampC* puede tener una función celular adicional como una hidrolasa de peptidoglicano (29, 143). Todos estos datos sugieren que la mutación del gen *PA5542* induciría en la bacteria una mayor sensibilidad a carbapenemas, al inactivarse su función como β -lactamasa, mientras que a su vez haría a la bacteria menos citotóxica por la imposibilidad de anclar en la membrana sistemas de secreción y factores de virulencia al presentar alteraciones del peptidoglicano, una situación que se ha descrito en *S. enterica* (278).

5.6 Análisis de una proteína de fusión implicada en la modulación intracelular de los niveles de di-GMPc

El gen *PA3704*, *wspE*, codifica un posible regulador de respuesta híbrido que posee una histidina quinasa. Este gen pertenece al sistema Wsp de *P. aeruginosa*. Se ha descrito que las proteínas que forman el sistema Wsp constituyen un complejo de transducción de señal similar a aquéllos que son responsables de la quimiotaxis en bacterias (19). De este modo, la señalización a través del complejo Wsp implicaría que *P. aeruginosa* usa este sistema para responder y adaptarse a señales, aún desconocidas, mediante cambios en los niveles intracelulares de diGMPc y la transición desde un estado de vida libre a un estado de vida en *biofilm* (146). La unión de nucleótidos cíclicos a proteínas reguladoras es un componente importante dentro de la variedad de vías intracelulares de señalización. En procariotas, se sabe que el AMPc es un co-regulador transcripcional de genes relacionados con el metabolismo y la virulencia de la bacteria (117, 320). El diGMPc está involucrado en la regulación de la expresión de un número importante de proteínas y carbohidratos presentes en la superficie de procariotas. Un homólogo de este sistema en *P. fluorescens* regula la síntesis de celulosa mediante mecanismos que aún se desconocen (19).

Como se ha mencionado anteriormente, el sistema Wsp está involucrado en la formación de *biofilms* (146). Hasta el momento se han caracterizado dos proteínas pertenecientes a este sistema: WspR, una enzima implicada en la síntesis de di-GMPc y WspF, un regulador negativo de WspR. Se ha demostrado que la delección de *wspF* provoca un incremento de los niveles intracelulares de diGMPc posiblemente mediante la estimulación de la síntesis de diGMPc catalizada por WspR fosforilada, lo que conduce a un aumento de la formación de *biofilms*. Por otro lado, también se ha observado que los niveles aumentados de diGMPc provocan una mayor formación de *biofilm* como consecuencia del incremento en la producción de exopolisacáridos en *P. aeruginosa* (146). En el mutante de inserción en el gen *PA3704* en la cepa TB y el correspondiente mutante de delección en PA14, la formación del *biofilm* es superior a la de la cepa silvestre. La complementación con *wspE* es capaz de revertir el fenotipo incluso a valores inferiores que los de su cepa control. En el mutante de delección del gen *wspE* en PAO1 se aprecia una ligera disminución en su capacidad de formar *biofilms*, lo que estaría de acuerdo con estudios anteriores en los que no se observa fenotipo al deleccionar este gen del cromosoma de PAO1 (146). Aunque los sistemas de quimiotaxis están bastante conservados entre las cepas de *P. aeruginosa*, se ha visto que mutantes en *pilJ*, miembro de otro de los sistemas de quimiotaxis en *P. aeruginosa*, son diferentes en motilidad tipo *twitching* en PAO1 (69) o PAK (368), demostrándose que puede haber diferencias en este sistema entre estas dos cepas. Igualmente interesante es que, en este mismo estudio, otro gen implicado en sistemas de quimiotaxis, *chpA*, clonado del genoma de PAO1, no era capaz de complementar la motilidad tipo *twitching* en mutantes en este gen en PAK (368). Por tanto, es posible que las diferencias de secuencias entre cepas de *P. aeruginosa*, en nuestro caso, TB, PA14 y PAO1, puedan explicar la incapacidad de

estos clones para complementar los mutantes en TB o los distintos fenotipos observados en los mutantes de delección.

Tomando como ejemplo la regulación del sistema Che en *E. coli*, se ha determinado que en el sistema Wsp es importante la acción de WspC, una metiltransferasa y el papel de WspF, una metilesterasa, cuyas actividades opuestas forman un modelo de regulación retroalimentado que controla la actividad de la quinasa WspE. La proteína WspE contiene regiones homólogas al dominio histidina quinasa de CheA y al dominio regulador de respuesta de CheY. El dominio similar a CheA de WspE tiene tres módulos distintos: el módulo Hpt, que contiene residuos clave para la autofosforilación de la quinasa, el módulo catalítico responsable de la actividad quinasa, y un módulo esencial para la regulación mediada por receptor (que contiene los sitios CheW y sitio de unión a receptor). Se ha demostrado que los siete genes *wsp* forman una unidad transcripcional, de modo que es la misma vía Wsp la que dona los grupos fosfatos a WspR y el mayor candidato para ello es WspE (63, 146). Teniendo en cuenta este modelo, la inserción en el gen *wspE* podría producir una forma constitutivamente activa que fosforilara de forma continua a WspR y se produjera un aumento en la formación de *biofilms*. Por otro lado, observamos que la mutación en el gen *wspE* producía un aumento de la citotoxicidad con respecto a la cepa silvestre. En *P. aeruginosa* son dos los sistemas reguladores que en respuesta a cambios en el ambiente se han visto implicados que afectan los niveles de diGMPc. Uno es el sistema Wsp. El segundo de estos sistemas es rocS1RA1/sadSRA que fue identificado simultáneamente por Kuchma y Kulasekara en un análisis de mutantes con una capacidad alterada para formar *biofilms* (178, 183). Este sistema antagoniza la acción del sistema Wsp mediante un dominio EAL que posee la proteína RocR/SadR. Se ha visto que este sistema también controla genes que codifican el T3SS en *P. aeruginosa* y lo hace de forma inversa a la regulación de la formación de *biofilms* (178).

5.7 Análisis de un transportador tipo RND implicado en la resistencia y la virulencia de *P. aeruginosa*

El sistema PA2528-PA2527-PA2526-OmpB ha sido caracterizado durante la escritura de este memoria de Tesis y ha sido denominado MuxA-MuxB-MuxC-OmpB (241). El sistema MuxA-MuxB-MuxC-OmpB presenta una alta similitud al sistema MdtABC de *E. coli*. El sistema MdtABC comprende un heteromultímero transmembrana MdtB/MdtC y una proteína de fusión a membrana (250). Se ha visto que ni *mdtA*, *mdtB*, ni *mdtC* proporcionan resistencia a drogas cuando se sobre-expresan individualmente. En *E. coli* se ha visto que los dos componentes RND son esenciales para la funcionalidad completa del sistema (21, 250). En la caracterización de este sistema en *P. aeruginosa* se vio que las CMI de aztreonam y novobiocina eran similares para la cepa control y para las células transformadas con plásmidos que expresan todos los componentes de la bomba menos MuxB o MuxC (241). En nuestro caso, en el mutante de delección en PAO1 sí observamos variaciones en la CMI en dos de los seis antibióticos analizados, lo que podría indicar que el efecto es mas acusado en la especie original que en una especie heteróloga. El gen *ompB* codifica la porina del sistema *muxABC*. Hasta el momento no se ha encontrado una porina que pueda reemplazar la función de *ompB* en este sistema (241). La sobre-expresión de *muxABC*, sin *ompB*, se ha visto que confiere sensibilidad elevada a los antibióticos. La razón que se ha señalado como la responsable de este fenotipo es que el sistema MuxABC sobreproducido pueda competir por un componente OMP de otra bomba o bombas funcionales, y dado que MuxABC no puede funcionar con otra porina que no sea OmpB, la sobreexpresión de este sistema RND contribuiría a disminuir la cantidad disponible de otras porinas haciendo que otros sistemas, en principio funcionales, no pudieran actuar más como bombas (241). De este modo, se explicaría el aumento de la sensibilidad a los antibióticos al sobreproducir el sistema MuxABC carente de OmpB. Estos resultados están de acuerdo con los datos derivados de nuestro estudio, donde el

mutante de inserción en *muxB* complementado no es sólo incapaz de recuperar los niveles de la cepa silvestre, si no que éstos bajan drásticamente en todos los parámetros analizados.

Dentro de los factores de virulencia que presentan una mayor diferencia entre el mutante de inserción y delección comparados con sus cepas silvestres debemos citar la formación de *biofilms*. Se ha visto en diversos trabajos que proteínas involucradas en la resistencia a los antibióticos estaban incrementadas durante los estados de maduración y dispersión del *biofilm* (333). Entre los genes expresados diferencialmente se encuentran componentes de sistemas RND. Este es el caso del sistema MexGHI-OmpD. Dentro de este sistema se determinó que la proteína MexH era esencial en la formación del *biofilm* y crítica en el proceso de maduración de esta estructura (333). MexH es un componente RND dentro del sistema MexGHI (3), como es el caso de PA2527 (MuxB) en el sistema MuxABC. De modo, que la inserción del transposón y la delección tendrían un efecto negativo en la formación del *biofilm* como se observa en nuestros resultados. En otros estudios, Aendekerk et al., han visto que el sistema MexGHI-OmpD facilita la comunicación célula-célula y promueve la virulencia, y el crecimiento en *P. aeruginosa* (2). Además este sistema confiere resistencia a vanadio (3). El efecto de MexH en la formación del *biofilm* se ha considerado un efecto indirecto de la molécula de QS 3-oxo-C12-HSL (333). Estudios recientes indican que MexGHI-OmpD (2) y que potencialmente MexAB-OprM (270) están involucradas en la homeostasis de acil-homoserín lactonas que participan activamente en la expulsión de 3-oxo-C12-HSL. En *P. aeruginosa*, las acil homoserin lactonas controlan la expresión de factores de virulencia extracelulares y el aparato de secreción tipo II. Además estas señales controlan la diferenciación del *biofilm*. Los *biofilms* defectivos en 3-oxo-c12-HSL son *biofilms* planos y desestructurados (73, 173). Análogamente a MexGHI-OmpD y MexAB-OprM, el sistema MuxABC-OmpB podría expulsar moléculas de QS, explicando así el fenotipo alterado del mutante en MuxB en citotoxicidad y en la secreción de factores de virulencia.

5.8 Modelos de infección crónica en pulmón de ratón con *P. aeruginosa*

La infección por *P. aeruginosa* en animales normales, particularmente en ratones, mimetiza algunos de los eventos histopatológicos que se visualizan en pulmones de CF infectados, aunque hay importantes diferencias entre ambas especies. Para alcanzar una infección crónica la bacteria debe ser inoculada intra-traquealmente con un agente inmovilizante como agar, agarosa, o alginato (357). Por el contrario, la administración de la bacteria vía endotraqueal con aerosol o inyectada simula una infección aguda. En diversos estudios se ha podido comprobar que en cepas de ratón, identificadas como resistentes o sensibles a la infección broncopulmonar crónica por *P. aeruginosa* ha sido muy útil la identificación de otros genes, aparte de *CFTR*, que son importantes para la regulación de la resistencia del hospedador a esta infección en pacientes de CF. Estos modelos en ratón han permitido, además, la definición del papel de la respuestas inflamatoria e inmune del hospedador a la hora de protegerse de la infección por *P. aeruginosa*.

Dado que las cepas que producen infecciones crónicas evolucionan hacia menores niveles de citotoxicidad (328), hemos analizado el efecto de dos mutaciones, que conllevan respectivamente mayor y menor citotoxicidad, en modelos de infección crónica y aguda. Ambos mutantes tienen un comportamiento semejante en el modelo de infección aguda y el menos citotóxico (mutante de inserción en el componente RND MuxB de la bomba MDR MuxABC-OmpB) parece ser algo más eficaz en el modelo de infección crónica. Sin embargo, los datos no son concluyentes y es necesario hacer estudios de competición o de infección con número mayor de ratones por muestra para que los datos tengan la validez estadística necesaria.

En base a los estudios analizados en la presente Discusión, se plantean las siguientes conclusiones:

6 Conclusiones

1.- La mayor parte de las mutaciones analizadas producen cambios en la sensibilidad a varios antibióticos. Esto nos indica que la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* es, en gran medida, inespecífica. La capacidad de *P. aeruginosa* para adquirir resistencia por mutación es muy elevada.

2.- La gran mayoría de los genes catalogados en nuestro estudio no han sido previamente identificados como implicados en resistencia a los antibióticos en esta especie bacteriana. Por tanto, nuestro trabajo revela un resistoma intrínseco desconocido hasta ahora en *P. aeruginosa*.

3.- La adquisición de resistencia no va siempre asociada a una disminución de la virulencia (*fitness cost*), sino que dicha virulencia puede ser incluso mayor, indicando por tanto que los efectos de la resistencia son bastante específicos y dependientes del tipo de mecanismo y de la estirpe implicados.

4.- El fenotipo de virulencia y resistencia a los antibióticos de *P. aeruginosa* engloba una compleja red de elementos que conectan ambos fenotipos e incluyen genes no clásicos de resistencia y virulencia. Entre los distintos mecanismos implicados en esta interconexión, hemos comenzado a analizar los elementos que se describen en las conclusiones siguientes, y plantear hipótesis sobre su mecanismo de acción.

5.- El gen *PA4112* codifica un sensor-regulador híbrido que podría intervenir de forma directa o indirecta en el balance de RNAs pequeños que regulan inversamente la expresión de genes involucrados en infección aguda y crónica. Dicho sensor/regulador podría estar implicado en la resistencia de *P. aeruginosa* mediante el control del posible sistema MFS codificado por el gen *PA4113* adyacente a *PA4112*.

6.- La proteína codificada por el gen *PA5542* tiene actividad β -lactamasa y es capaz de hidrolizar imipenem. La mutación en *PA5542* podría producir perturbaciones en el proceso de síntesis o remodelación del peptidoglicano que perjudicarían fenotipos importantes relacionados con la virulencia de *P. aeruginosa*.

7.- El gen *wspE* pertenece a un sistema involucrado en la regulación de los niveles intracelulares de diGMPc. A través de la modulación de la concentración de esta molécula, este sistema podría controlar genes que codifican el T3SS en *P. aeruginosa* de forma inversa a la regulación de la formación de *biofilms*.

8.- El gen *muxB* codifica un componente de un sistema MDR que está implicado en la resistencia a los antibióticos de *P. aeruginosa* y podría estar implicado en la comunicación bacteriana mediante la señalización por *Quórum Sensing*.

7 Referencias bibliográficas

1. **Adamo, R., S. Sokol, G. Soong, M. I. Gomez, and A. Prince.** 2004. *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *Am J Respir Cell Mol Biol* **30**:627-34.
2. **Aendekerk, S., S. P. Diggle, Z. Song, N. Hoiby, P. Cornelis, P. Williams, and M. Camara.** 2005. The MexGHI-OpmD multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication. *Microbiology* **151**:1113-25.
3. **Aendekerk, S., B. Ghysels, P. Cornelis, and C. Baysse.** 2002. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology* **148**:2371-81.
4. **Albus, A. M., E. C. Pesci, L. J. Runyen-Janecky, S. E. West, and B. H. Iglewski.** 1997. Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**:3928-35.
5. **Alcorn, J. F., and J. R. Wright.** 2004. Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *J Biol Chem* **279**:30871-9.
6. **Alonso, A., G. Morales, R. Escalante, E. Campanario, L. Sastre, and J. L. Martinez.** 2004. Overexpression of the multidrug efflux pump SmeDEF impairs *Stenotrophomonas maltophilia* physiology. *J Antimicrob Chemother* **53**:432-4.
7. **Alonso, A., F. Rojo, and J. L. Martinez.** 1999. Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. *Environ Microbiol* **1**:421-30.
8. **Alonso, A., P. Sanchez, and J. L. Martinez.** 2001. Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol* **3**:1-9.
9. **Allen, L., D. H. Dockrell, T. Pattery, D. G. Lee, P. Cornelis, P. G. Hellewell, and M. K. Whyte.** 2005. Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo. *J Immunol* **174**:3643-9.
10. **Allesen-Holm, M., K. B. Barken, L. Yang, M. Klausen, J. S. Webb, S. Kjelleberg, S. Molin, M. Givskov, and T. Tolker-Nielsen.** 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* **59**:1114-28.
11. **Allewelt, M., F. T. Coleman, M. Grout, G. P. Priebe, and G. B. Pier.** 2000. Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infect Immun* **68**:3998-4004.
12. **Andersson, D. I.** 2006. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Curr Opin Microbiol* **9**:461-5.
13. **Andersson, D. I., and B. R. Levin.** 1999. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* **2**:489-93.

14. **Arora, S. K., A. N. Neely, B. Blair, S. Lory, and R. Ramphal.** 2005. Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections. *Infect Immun* **73**:4395-8.
15. **Atlas, R. M.** 1993. Handbook of microbiological media, London: CRC Press, Inc.
16. **Azghani, A. O., J. W. Baker, S. Shetty, E. J. Miller, and G. J. Bhat.** 2002. *Pseudomonas aeruginosa* elastase stimulates ERK signaling pathway and enhances IL-8 production by alveolar epithelial cells in culture. *Inflamm Res* **51**:506-10.
17. **Backhed, F., S. Normark, E. K. Schweda, S. Oscarson, and A. Richter-Dahlfors.** 2003. Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: a biological role for LPS modifications. *Microbes Infect* **5**:1057-63.
18. **Balke, B., L. Hoy, H. Weissbrodt, and S. Haussler.** 2004. Comparison of the Micronaut Merlin automated broth microtiter system with the standard agar dilution method for antimicrobial susceptibility testing of mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **23**:765-71.
19. **Bantinaki, E., R. Kassen, C. G. Knight, Z. Robinson, A. J. Spiers, and P. B. Rainey.** 2007. Adaptive divergence in experimental populations of *Pseudomonas fluorescens*. III. Mutational origins of wrinkly spreader diversity. *Genetics* **176**:441-53.
20. **Baquero F, B. J. y. M. J.** 2002. Mutación y Resistencia a los Antibióticos. Investigación y Ciencia
21. **Baranova, N., and H. Nikaido.** 2002. The baeSR two-component regulatory system activates transcription of the yegMNOB (mdtABCD) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate. *J Bacteriol* **184**:4168-76.
22. **Barbieri, J. T., and J. Sun.** 2004. *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **152**:79-92.
23. **Beare, P. A., R. J. For, L. W. Martin, and I. L. Lamont.** 2003. Siderophore-mediated cell signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: divergent pathways regulate virulence factor production and siderophore receptor synthesis. *Mol Microbiol* **47**:195-207.
24. **Benitez, J. A., A. J. Silva, and R. A. Finkelstein.** 2001. Environmental signals controlling production of hemagglutinin/protease in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **69**:6549-53.
25. **Benveniste, R., and J. Davies.** 1973. Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**:2276-80.
26. **Berk, R. S., D. Brown, I. Coutinho, and D. Meyers.** 1987. In vivo studies with two phospholipase C fractions from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **55**:1728-30.
27. **Berka, R. M., and M. L. Vasil.** 1982. Phospholipase C (heat-labile hemolysin) of *Pseudomonas aeruginosa*: purification and preliminary characterization. *J Bacteriol* **152**:239-45.
28. **Beveridge, T. J., S. A. Makin, J. L. Kadurugamuwa, and Z. Li.** 1997. Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiol Rev* **20**:291-303.
29. **Bishop, R. E., and J. H. Weiner.** 1993. Complementation of growth defect in an ampC deletion mutant of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **114**:349-54.

30. **Bjarnsholt, T., and M. Givskov.** 2007. The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal Bioanal Chem* **387**:409-14.
31. **Bjorkman, J., D. Hughes, and D. I. Andersson.** 1998. Virulence of antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:3949-53.
32. **Blaylock, B., K. E. Riordan, D. M. Missiakas, and O. Schneewind.** 2006. Characterization of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL. *J Bacteriol* **188**:3525-34.
33. **Bleves, S., M. N. Marenne, G. Detry, and G. R. Cornelis.** 2002. Up-regulation of the *Yersinia enterocolitica* yop regulon by deletion of the flagellum master operon flhDC. *J Bacteriol* **184**:3214-23.
34. **Bleves, S., C. Soscia, P. Nogueira-Orlandi, A. Lazdunski, and A. Filloux.** 2005. Quorum sensing negatively controls type III secretion regulon expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **187**:3898-902.
35. **Blocker, A., K. Komoriya, and S. Aizawa.** 2003. Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:3027-30.
36. **Bouma, J. E., and R. E. Lenski.** 1988. Evolution of a bacteria/plasmid association. *Nature* **335**:351-2.
37. **Breidenstein, E. B., B. K. Khaira, I. Wiegand, J. Overhage, and R. E. Hancock.** 2008. Complex ciprofloxacin resistome revealed by screening a *Pseudomonas aeruginosa* mutant library for altered susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:4486-91.
38. **Brinkman, F. S., E. L. Macfarlane, P. Warrenner, and R. E. Hancock.** 2001. Evolutionary relationships among virulence-associated histidine kinases. *Infect Immun* **69**:5207-11.
39. **Britigan, B. E., M. B. Hayek, B. N. Doebbeling, and R. B. Fick, Jr.** 1993. Transferrin and lactoferrin undergo proteolytic cleavage in the *Pseudomonas aeruginosa*-infected lungs of patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* **61**:5049-55.
40. **Broderick, K. E., A. Chan, M. Balasubramanian, J. Feala, S. L. Reed, M. Panda, V. S. Sharma, R. B. Pilz, T. D. Bigby, and G. R. Boss.** 2008. Cyanide produced by human isolates of *Pseudomonas aeruginosa* contributes to lethality in *Drosophila melanogaster*. *J Infect Dis* **197**:457-64.
41. **Brutinel, E. D., and T. L. Yahr.** 2008. Control of gene expression by type III secretory activity. *Curr Opin Microbiol* **11**:128-33.
42. **Burghout, P., F. Beckers, E. de Wit, R. van Boxtel, G. R. Cornelis, J. Tommassen, and M. Koster.** 2004. Role of the pilot protein YscW in the biogenesis of the YscC secretin in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **186**:5366-75.
43. **Burns, R. E., A. McDaniel-Craig, and A. Sukhan.** 2008. Site-directed mutagenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system protein PscJ reveals an essential role for surface-localized residues in needle complex function. *Microb Pathog* **45**:225-30.
44. **Caiazza, N. C., J. H. Merritt, K. M. Brothers, and G. A. O'Toole.** 2007. Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* **189**:3603-12.

45. **Calfee, M. W., J. P. Coleman, and E. C. Pesci.** 2001. Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:11633-7.
46. **Cao, H., R. L. Baldini, and L. G. Rahme.** 2001. Common mechanisms for pathogens of plants and animals. *Annu Rev Phytopathol* **39**:259-84.
47. **Cao, H., G. Krishnan, B. Goumnerov, J. Tsongalis, R. Tompkins, and L. G. Rahme.** 2001. A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:14613-8.
48. **Cappa, F., D. Cattivelli, and P. S. Cocconcelli.** 2005. The *uvrA* gene is involved in oxidative and acid stress responses in *Lactobacillus helveticus* CNBL1156. *Res Microbiol* **156**:1039-47.
49. **Carattoli, A.** 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet Res* **32**:243-59.
50. **Carilla-Latorre, S., J. Calvo-Garrido, G. Bloomfield, J. Skelton, R. R. Kay, A. Ivens, J. L. Martinez, and R. Escalante.** 2008. Dictyostelium transcriptional responses to *Pseudomonas aeruginosa*: common and specific effects from PAO1 and PA14 strains. *BMC Microbiol* **8**:109.
51. **Cobb, L. M., J. C. Mychaleckyj, D. J. Wozniak, and Y. S. Lopez-Boado.** 2004. *Pseudomonas aeruginosa* flagellin and alginate elicit very distinct gene expression patterns in airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis disease. *J Immunol* **173**:5659-70.
52. **Cochrane, D. M., M. R. Brown, H. Anwar, P. H. Weller, K. Lam, and J. W. Costerton.** 1988. Antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* surface protein antigens in a rat model of chronic lung infection. *J Med Microbiol* **27**:255-61.
53. **Condon, C., and J. H. Weiner.** 1988. Fumarate reductase of *Escherichia coli*: an investigation of function and assembly using in vivo complementation. *Mol Microbiol* **2**:43-52.
54. **Cornelis, G. R.** 2006. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**:811-25.
55. **Cosson, P., L. Zulianello, O. Join-Lambert, F. Faurisson, L. Gebbie, M. Benghezal, C. Van Delden, L. K. Curty, and T. Kohler.** 2002. *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a Dictyostelium discoideum host system. *J Bacteriol* **184**:3027-33.
56. **Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, and H. M. Lappin-Scott.** 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**:711-45.
57. **Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**:1318-22.
58. **Cox, C. D.** 1986. Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin. *Infect Immun* **52**:263-70.
59. **Craven, R., and T. C. Montie.** 1985. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* chemotaxis by the nitrogen source. *J Bacteriol* **164**:544-9.
60. **Chambers, H. F.** 1999. Penicillin-binding protein-mediated resistance in pneumococci and staphylococci. *J Infect Dis* **179 Suppl 2**:S353-9.

61. **Chastre, J., and J. Y. Fagon.** 2002. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **165**:867-903.
62. **Chastre, J., and J. L. Trouillet.** 2000. Problem pathogens (*Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*). *Semin Respir Infect* **15**:287-98.
63. **D'Argenio, D. A., M. W. Calfee, P. B. Rainey, and E. C. Pesci.** 2002. Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *J Bacteriol* **184**:6481-9.
64. **D'Costa, V. M., K. M. McGrann, D. W. Hughes, and G. D. Wright.** 2006. Sampling the antibiotic resistome. *Science* **311**:374-7.
65. **Dacheux, D., I. Attree, and B. Toussaint.** 2001. Expression of ExsA in trans confers type III secretion system-dependent cytotoxicity on noncytotoxic *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *Infect Immun* **69**:538-42.
66. **Dacheux, D., J. Goure, J. Chabert, Y. Usson, and I. Attree.** 2001. Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol Microbiol* **40**:76-85.
67. **Dacheux, D., B. Toussaint, M. Richard, G. Brochier, J. Croize, and I. Attree.** 2000. *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun* **68**:2916-24.
68. **Damron, F. H., D. Qiu, and H. D. Yu.** 2009. The *Pseudomonas aeruginosa* sensor kinase KinB negatively controls alginate production through AlgW-dependent MucA proteolysis. *J Bacteriol* **191**:2285-95.
69. **Darzins, A.** 1994. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene cluster involved in pilus biosynthesis and twitching motility: sequence similarity to the chemotaxis proteins of enterics and the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **11**:137-53.
70. **Darzins, A., and M. A. Russell.** 1997. Molecular genetic analysis of type-4 pilus biogenesis and twitching motility using *Pseudomonas aeruginosa* as a model system--a review. *Gene* **192**:109-15.
71. **Dasgupta, N., G. L. Lykken, M. C. Wolfgang, and T. L. Yahr.** 2004. A novel anti-activator mechanism regulates expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol* **53**:297-308.
72. **Davies, D. G., A. M. Chakrabarty, and G. G. Geesey.** 1993. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **59**:1181-6.
73. **Davies, D. G., M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton, and E. P. Greenberg.** 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**:295-8.
74. **Davies, J.** 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264**:375-82.
75. **Davies, J. A., J. J. Harrison, L. L. Marques, G. R. Foglia, C. A. Stremick, D. G. Storey, R. J. Turner, M. E. Olson, and H. Ceri.** 2007. The GacS sensor kinase controls phenotypic

reversion of small colony variants isolated from biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* PA14. FEMS Microbiol Ecol **59**:32-46.

76. **Davies, J. E.** 1997. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. Ciba Found Symp **207**:15-27; discussion 27-35.

77. **de Chial, M., B. Ghysels, S. A. Beatson, V. Geoffroy, J. M. Meyer, T. Pattery, C. Baysse, P. Chablain, Y. N. Parsons, C. Winstanley, S. J. Cordwell, and P. Cornelis.** 2003. Identification of type II and type III pyoverdine receptors from *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology **149**:821-31.

78. **de Kievit, T. R.** 2009. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Environ Microbiol **11**:279-88.

79. **de Kievit, T. R., and B. H. Iglewski.** 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. Infect Immun **68**:4839-49.

80. **de Lorenzo, V., and K. N. Timmis.** 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. Methods Enzymol **235**:386-405.

81. **Denamur, E., and I. Matic.** 2006. Evolution of mutation rates in bacteria. Mol Microbiol **60**:820-7.

82. **Denning, G. M., L. A. Wollenweber, M. A. Railsback, C. D. Cox, L. L. Stoll, and B. E. Britigan.** 1998. *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. Infect Immun **66**:5777-84.

83. **Depardieu, F., I. Podglajen, R. Leclercq, E. Collatz, and P. Courvalin.** 2007. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. Clin Microbiol Rev **20**:79-114.

84. **Deziel, E., F. Lepine, S. Milot, and R. Villemur.** 2003. rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. Microbiology **149**:2005-13.

85. **Diggie, S. P., K. Winzer, S. R. Chhabra, K. E. Worrall, M. Camara, and P. Williams.** 2003. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. Mol Microbiol **50**:29-43.

86. **Diggie, S. P., K. Winzer, A. Lazdunski, P. Williams, and M. Camara.** 2002. Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. J Bacteriol **184**:2576-86.

87. **DiMango, E., H. J. Zar, R. Bryan, and A. Prince.** 1995. Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. J Clin Invest **96**:2204-10.

88. **Dorman, C. J., N. N. Bhriain, and C. F. Higgins.** 1990. DNA supercoiling and environmental regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*. Nature **344**:789-92.

89. **Dotsch, A., T. Becker, C. Pommerenke, Z. Magnowska, L. Jansch, and S. Haussler.** 2009. Genomewide identification of genetic determinants of antimicrobial drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother **53**:2522-31.

90. **Drenkard, E., and F. M. Ausubel.** 2002. Pseudomonas biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* **416**:740-3.
91. **Duan, K., and M. G. Surette.** 2007. Environmental regulation of Pseudomonas aeruginosa PAO1 Las and Rhl quorum-sensing systems. *J Bacteriol* **189**:4827-36.
92. **Dubnau, D., and R. Losick.** 2006. Bistability in bacteria. *Mol Microbiol* **61**:564-72.
93. **Dulon, S., D. Leduc, G. S. Cottrell, J. D'Alayer, K. K. Hansen, N. W. Bunnett, M. D. Hollenberg, D. Pidard, and M. Chignard.** 2005. Pseudomonas aeruginosa elastase disables proteinase-activated receptor 2 in respiratory epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **32**:411-9.
94. **Eguchi, Y., T. Oshima, H. Mori, R. Aono, K. Yamamoto, A. Ishihama, and R. Utsumi.** 2003. Transcriptional regulation of drug efflux genes by EvgAS, a two-component system in Escherichia coli. *Microbiology* **149**:2819-28.
95. **Eichelberg, K., and J. E. Galan.** 2000. The flagellar sigma factor FliA (sigma(28)) regulates the expression of Salmonella genes associated with the centisome 63 type III secretion system. *Infect Immun* **68**:2735-43.
96. **Ellermeier, J. R., and J. M. Slauch.** 2007. Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Curr Opin Microbiol* **10**:24-9.
97. **Engebrecht, J., K. Neilson, and M. Silverman.** 1983. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from Vibrio fischeri. *Cell* **32**:773-81.
98. **Engel, J., and P. Balachandran.** 2009. Role of Pseudomonas aeruginosa type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol* **12**:61-6.
99. **Engel, L. S., J. M. Hill, A. R. Caballero, L. C. Green, and R. J. O'Callaghan.** 1998. Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from Pseudomonas aeruginosa. *J Biol Chem* **273**:16792-7.
100. **Epelman, S., D. Stack, C. Bell, E. Wong, G. G. Neely, S. Krutzik, K. Miyake, P. Kubes, L. D. Zbytnuik, L. L. Ma, X. Xie, D. E. Woods, and C. H. Mody.** 2004. Different domains of Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S activate distinct TLRs. *J Immunol* **173**:2031-40.
101. **Evans, K., L. Passador, R. Srikumar, E. Tsang, J. Nezezon, and K. Poole.** 1998. Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* **180**:5443-7.
102. **Fajardo, A., N. Martinez-Martin, M. Mercadillo, J. C. Galan, B. Ghysels, S. Matthijs, P. Cornelis, L. Wiehlmann, B. Tummler, F. Baquero, and J. L. Martinez.** 2008. The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS ONE* **3**:e1619.
103. **Fajardo, A., and J. L. Martinez.** 2008. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Curr Opin Microbiol* **11**:161-7.
104. **Feldman, M., R. Bryan, S. Rajan, L. Scheffler, S. Brunnert, H. Tang, and A. Prince.** 1998. Role of flagella in pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa pulmonary infection. *Infect Immun* **66**:43-51.

105. **Feltman, H., G. Schulert, S. Khan, M. Jain, L. Peterson, and A. R. Hauser.** 2001. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **147**:2659-69.
106. **Figurski, D. H., and D. R. Helinski.** 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:1648-52.
107. **Fleiszig, S. M., J. P. Wiener-Kronish, H. Miyazaki, V. Vallas, K. E. Mostov, D. Kanada, T. Sawa, T. S. Yen, and D. W. Frank.** 1997. *Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S. *Infect Immun* **65**:579-86.
108. **Francis, M. S., H. Wolf-Watz, and A. Forsberg.** 2002. Regulation of type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol* **5**:166-72.
109. **Frank, D. W.** 1997. The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **26**:621-9.
110. **Fraser, G. M., and C. Hughes.** 1999. Swarming motility. *Curr Opin Microbiol* **2**:630-5.
111. **Friedman, L., and R. Kolter.** 2004. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol Microbiol* **51**:675-90.
112. **Fujita, K., T. Akino, and H. Yoshioka.** 1988. Characteristics of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **56**:1385-7.
113. **Fuqua, W. C., S. C. Winans, and E. P. Greenberg.** 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**:269-75.
114. **Furste, J. P., W. Pansegrau, R. Frank, H. Blocker, P. Scholz, M. Bagdasarian, and E. Lanka.** 1986. Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range *tacP* expression vector. *Gene* **48**:119-31.
115. **Furukawa, S., S. L. Kuchma, and G. A. O'Toole.** 2006. Keeping their options open: acute versus persistent infections. *J Bacteriol* **188**:1211-7.
116. **Gahan, C. G., and C. Hill.** 2000. The use of listeriolysin to identify in vivo induced genes in the gram-positive intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **36**:498-507.
117. **Galperin, M. Y.** 2004. Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ Microbiol* **6**:552-67.
118. **Gallagher, L. A., and C. Manoil.** 2001. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *J Bacteriol* **183**:6207-14.
119. **Gallagher, L. A., S. L. McKnight, M. S. Kuznetsova, E. C. Pesci, and C. Manoil.** 2002. Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **184**:6472-80.
120. **Gambello, M. J., S. Kaye, and B. H. Iglewski.** 1993. LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect Immun* **61**:1180-4.

121. **Garey, K. W., Q. P. Vo, M. T. Larocco, L. O. Gentry, and V. H. Tam.** 2008. Prevalence of type III secretion protein exoenzymes and antimicrobial susceptibility patterns from bloodstream isolates of patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *J Chemother* **20**:714-20.
122. **Garrity-Ryan, L., B. Kazmierczak, R. Kowal, J. Comolli, A. Hauser, and J. N. Engel.** 2000. The arginine finger domain of ExoT contributes to actin cytoskeleton disruption and inhibition of internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells and macrophages. *Infect Immun* **68**:7100-13.
123. **Gatell, J. M., R. Marrades, M. el-Ebiary, and A. Torres.** 1996. Severe pulmonary infections in AIDS patients. *Semin Respir Infect* **11**:119-28.
124. **Geiser, T. K., B. I. Kazmierczak, L. K. Garrity-Ryan, M. A. Matthay, and J. N. Engel.** 2001. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT inhibits in vitro lung epithelial wound repair. *Cell Microbiol* **3**:223-36.
125. **Gilbert, P., P. J. Collier, and M. R. Brown.** 1990. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. *Antimicrob Agents Chemother* **34**:1865-8.
126. **Gilligan, P. H.** 1991. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **4**:35-51.
127. **Giraud, A., I. Matic, O. Tenaillon, A. Clara, M. Radman, M. Fons, and F. Taddei.** 2001. Costs and benefits of high mutation rates: adaptive evolution of bacteria in the mouse gut. *Science* **291**:2606-8.
128. **Giraud, E., A. Brisabois, J. L. Martel, and E. Chaslus-Dancla.** 1999. Comparative studies of mutations in animal isolates and experimental in vitro- and in vivo-selected mutants of *Salmonella* spp. suggest a counterselection of highly fluoroquinolone-resistant strains in the field. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:2131-7.
129. **Goodman, A. L., B. Kulasekara, A. Rietsch, D. Boyd, R. S. Smith, and S. Lory.** 2004. A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev Cell* **7**:745-54.
130. **Goure, J., A. Pastor, E. Faudry, J. Chabert, A. Dessen, and I. Attree.** 2004. The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. *Infect Immun* **72**:4741-50.
131. **Govan, J. R., and V. Deretic.** 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* **60**:539-74.
132. **Graham, J. E., and J. E. Clark-Curtiss.** 1999. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:11554-9.
133. **Gupta, S. K., R. S. Berk, S. Masinick, and L. D. Hazlett.** 1994. Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1. *Infect Immun* **62**:4572-9.
134. **Hahn, H. P.** 1997. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*--a review. *Gene* **192**:99-108.

135. **Hall, R. M., and C. M. Collis.** 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* **15**:593-600.
136. **Hamood, A. N., M. J. Wick, and B. H. Iglewski.** 1990. Secretion of toxin A from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, PAK, and PA103 by *Escherichia coli*. *Infect Immun* **58**:1133-40.
137. **Hancock, R. E.** 1998. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* **27 Suppl 1**:S93-9.
138. **Hancock, R. E., L. M. Mutharia, L. Chan, R. P. Darveau, D. P. Speert, and G. B. Pier.** 1983. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infect Immun* **42**:170-7.
139. **Hancock, R. E., and D. P. Speert.** 2000. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist Updat* **3**:247-255.
140. **Hanna, M. N., R. J. Ferguson, Y. H. Li, and D. G. Cvitkovitch.** 2001. *uvrA* is an acid-inducible gene involved in the adaptive response to low pH in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* **183**:5964-73.
141. **Harbarth, S., J. Garbino, J. Pugin, J. A. Romand, D. Lew, and D. Pittet.** 2003. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. *Am J Med* **115**:529-35.
142. **Hay, I. D., U. Remminghorst, and B. H. Rehm.** 2009. MucR, a novel membrane-associated regulator of alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **75**:1110-20.
143. **Henderson, T. A., K. D. Young, S. A. Denome, and P. K. Elf.** 1997. AmpC and AmpH, proteins related to the class C beta-lactamases, bind penicillin and contribute to the normal morphology of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**:6112-21.
144. **Henrichfreise, B., I. Wiegand, I. Luhmer-Becker, and B. Wiedemann.** 2007. Development of resistance in wild-type and hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* strains exposed to clinical pharmacokinetic profiles of meropenem and ceftazidime simulated in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:3642-9.
145. **Hentzer, M., G. M. Teitzel, G. J. Balzer, A. Heydorn, S. Molin, M. Givskov, and M. R. Parsek.** 2001. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol* **183**:5395-401.
146. **Hickman, J. W., D. F. Tifrea, and C. S. Harwood.** 2005. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:14422-7.
147. **Hirakata, Y., N. Furuya, K. Tateda, T. Matsumoto, and K. Yamaguchi.** 1995. The influence of exo-enzyme S and proteases on endogenous *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in mice. *J Med Microbiol* **43**:258-61.
148. **Hirakata, Y., R. Srikumar, K. Poole, N. Gotoh, T. Suematsu, S. Kohno, S. Kamihira, R. E. Hancock, and D. P. Speert.** 2002. Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Exp Med* **196**:109-18.
149. **Hogan, D., and R. Kolter.** 2002. Why are bacteria refractory to antimicrobials? *Curr Opin Microbiol* **5**:472-7.

150. **Hogardt, M., M. Roeder, A. M. Schreff, L. Eberl, and J. Heesemann.** 2004. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* *exoS* is controlled by quorum sensing and RpoS. *Microbiology* **150**:843-51.
151. **Holder, I. A., A. N. Neely, and D. W. Frank.** 2001. Type III secretion/intoxication system important in virulence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in burns. *Burns* **27**:129-30.
152. **Holm, B. A., L. Keicher, M. Y. Liu, J. Sokolowski, and G. Enhorning.** 1991. Inhibition of pulmonary surfactant function by phospholipases. *J Appl Physiol* **71**:317-21.
153. **Holmes, A. J., M. R. Gillings, B. S. Nield, B. C. Mabbutt, K. M. Nevalainen, and H. W. Stokes.** 2003. The gene cassette metagenome is a basic resource for bacterial genome evolution. *Environ Microbiol* **5**:383-94.
154. **Hong, Y. Q., and B. Ghebrehiwet.** 1992. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. *Clin Immunol Immunopathol* **62**:133-8.
155. **Howe, T. R., and B. H. Iglewski.** 1984. Isolation and characterization of alkaline protease-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in a mouse eye model. *Infect Immun* **43**:1058-63.
156. **Huang, J. J., A. Petersen, M. Whiteley, and J. R. Leadbetter.** 2006. Identification of QuiP, the product of gene PA1032, as the second acyl-homoserine lactone acylase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol* **72**:1190-7.
157. **Hueck, C. J.** 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:379-433.
158. **Ibrahim, E. H., G. Sherman, S. Ward, V. J. Fraser, and M. H. Kollef.** 2000. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest* **118**:146-55.
159. **Jain, M., D. Ramirez, R. Seshadri, J. F. Cullina, C. A. Powers, G. S. Schulert, M. Bar-Meir, C. L. Sullivan, S. A. McColley, and A. R. Hauser.** 2004. Type III secretion phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains change during infection of individuals with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **42**:5229-37.
160. **Jalal, S., O. Ciofu, N. Hoiby, N. Gotoh, and B. Wretling.** 2000. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:710-2.
161. **Jaouen, T., L. Coquet, L. Marvin-Guy, N. Orange, S. Chevalier, and E. De.** 2006. Functional characterization of *Pseudomonas fluorescens* OprE and OprQ membrane proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **346**:1048-52.
162. **Johnson, M. K., and J. H. Allen.** 1978. The role of hemolysin in corneal infections with *Pseudomonas aeruginosa*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **17**:480-3.
163. **Johnson, M. K., and D. Boese-Marrazzo.** 1980. Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **29**:1028-33.
164. **Journet, L., C. Agrain, P. Broz, and G. R. Cornelis.** 2003. The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science* **302**:1757-60.

165. **Kadurugamuwa, J. L., and T. J. Beveridge.** 1996. Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. *J Bacteriol* **178**:2767-74.
166. **Kadurugamuwa, J. L., and T. J. Beveridge.** 1997. Natural release of virulence factors in membrane vesicles by *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of aminoglycoside antibiotics on their release. *J Antimicrob Chemother* **40**:615-21.
167. **Kadurugamuwa, J. L., and T. J. Beveridge.** 1995. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J Bacteriol* **177**:3998-4008.
168. **Kaneko, T., S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Hirosawa, M. Sugiura, S. Sasamoto, T. Kimura, T. Hosouchi, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, K. Naruo, S. Okumura, S. Shimpo, C. Takeuchi, T. Wada, A. Watanabe, M. Yamada, M. Yasuda, and S. Tabata.** 1996. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res* **3**:109-36.
169. **Kaniga, K., I. Delor, and G. R. Cornelis.** 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**:137-41.
170. **Kehres, D. G., M. L. Zaharik, B. B. Finlay, and M. E. Maguire.** 2000. The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol Microbiol* **36**:1085-100.
171. **Khoury, A. E., K. Lam, B. Ellis, and J. W. Costerton.** 1992. Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. *Asaio J* **38**:M174-8.
172. **Kipnis, E., T. Sawa, and J. Wiener-Kronish.** 2006. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect* **36**:78-91.
173. **Kjelleberg, S., and S. Molin.** 2002. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Curr Opin Microbiol* **5**:254-8.
174. **Kohler, T., L. K. Curty, F. Barja, C. van Delden, and J. C. Pechere.** 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* **182**:5990-6.
175. **Kohler, T., C. van Delden, L. K. Curty, M. M. Hamzehpour, and J. C. Pechere.** 2001. Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**:5213-22.
176. **Konig, B., K. E. Jaeger, A. E. Sage, M. L. Vasil, and W. Konig.** 1996. Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in inflammatory mediator release from human inflammatory effector cells (platelets, granulocytes, and monocytes). *Infect Immun* **64**:3252-8.
177. **Koster, M., W. Bitter, H. de Cock, A. Allaoui, G. R. Cornelis, and J. Tommassen.** 1997. The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol Microbiol* **26**:789-97.

178. **Kuchma, S. L., J. P. Connolly, and G. A. O'Toole.** 2005. A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**:1441-54.
179. **Kudoh, I., J. P. Wiener-Kronish, S. Hashimoto, J. F. Pittet, and D. Frank.** 1994. Exoproduct secretions of *Pseudomonas aeruginosa* strains influence severity of alveolar epithelial injury. *Am J Physiol* **267**:L551-6.
180. **Kuehn, M. J., and N. C. Kesty.** 2005. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev* **19**:2645-55.
181. **Kulasakara, H., V. Lee, A. Brencic, N. Liberati, J. Urbach, S. Miyata, D. G. Lee, A. N. Neely, M. Hyodo, Y. Hayakawa, F. M. Ausubel, and S. Lory.** 2006. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:2839-44.
182. **Kulasekara, B. R., H. D. Kulasekara, M. C. Wolfgang, L. Stevens, D. W. Frank, and S. Lory.** 2006. Acquisition and evolution of the *exoU* locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**:4037-50.
183. **Kulasekara, H. D., I. Ventre, B. R. Kulasekara, A. Lazdunski, A. Filloux, and S. Lory.** 2005. A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes. *Mol Microbiol* **55**:368-80.
184. **Kurioka, S., and P. V. Liu.** 1967. Effect of the hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa* on phosphatides and on phospholipase c activity. *J Bacteriol* **93**:670-4.
185. **Labaer, J., Q. Qiu, A. Anumanthan, W. Mar, D. Zuo, T. V. Murthy, H. Taycher, A. Halleck, E. Hainsworth, S. Lory, and L. Brizuela.** 2004. The *Pseudomonas aeruginosa* PA01 gene collection. *Genome Res* **14**:2190-200.
186. **Lam, J., R. Chan, K. Lam, and J. W. Costerton.** 1980. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect Immun* **28**:546-56.
187. **Lamont, I. L., P. A. Beare, U. Ochsner, A. I. Vasil, and M. L. Vasil.** 2002. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:7072-7.
188. **Lapouge, K., M. Schubert, F. H. Allain, and D. Haas.** 2008. Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol Microbiol* **67**:241-53.
189. **Laskowski, M. A., E. Osborn, and B. I. Kazmierczak.** 2004. A novel sensor kinase-response regulator hybrid regulates type III secretion and is required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **54**:1090-103.
190. **Latifi, A., M. Foglino, K. Tanaka, P. Williams, and A. Lazdunski.** 1996. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* **21**:1137-46.
191. **Lau, G. W., H. Ran, F. Kong, D. J. Hassett, and D. Mavrodi.** 2004. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect Immun* **72**:4275-8.

192. **Ledgham, F., C. Soscia, A. Chakrabarty, A. Lazdunski, and M. Foglino.** 2003. Global regulation in *Pseudomonas aeruginosa*: the regulatory protein AlgR2 (AlgQ) acts as a modulator of quorum sensing. *Res Microbiol* **154**:207-13.
193. **Ledgham, F., I. Ventre, C. Soscia, M. Foglino, J. N. Sturgis, and A. Lazdunski.** 2003. Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhIR. *Mol Microbiol* **48**:199-210.
194. **Lee, B., J. A. Haagensen, O. Ciofu, J. B. Andersen, N. Hoiby, and S. Molin.** 2005. Heterogeneity of biofilms formed by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **43**:5247-55.
195. **Lee, D. G., J. M. Urbach, G. Wu, N. T. Liberati, R. L. Feinbaum, S. Miyata, L. T. Diggins, J. He, M. Saucier, E. Deziel, L. Friedman, L. Li, G. Grills, K. Montgomery, R. Kucherlapati, L. G. Rahme, and F. M. Ausubel.** 2006. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol* **7**:R90.
196. **Lee, N., K. Y. Yuen, and C. R. Kumana.** 2003. Clinical role of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations. *Drugs* **63**:1511-24.
197. **Lee, V. T., R. S. Smith, B. Tummler, and S. Lory.** 2005. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection. *Infect Immun* **73**:1695-705.
198. **Leidal, K. G., K. L. Munson, and G. M. Denning.** 2001. Small molecular weight secretory factors from *Pseudomonas aeruginosa* have opposite effects on IL-8 and RANTES expression by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **25**:186-95.
199. **Levin, B. R., and D. E. Rozen.** 2006. Non-inherited antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* **4**:556-62.
200. **Lewenza, S., R. K. Falsafi, G. Winsor, W. J. Gooderham, J. B. McPhee, F. S. Brinkman, and R. E. Hancock.** 2005. Construction of a mini-Tn5-luxCDABE mutant library in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a tool for identifying differentially regulated genes. *Genome Res* **15**:583-9.
201. **Li, X. Z., N. Barre, and K. Poole.** 2000. Influence of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-oprJ and MexE-MexF-oprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **46**:885-93.
202. **Li, Z., C. Kelley, F. Collins, D. Rouse, and S. Morris.** 1998. Expression of *katG* in *Mycobacterium tuberculosis* is associated with its growth and persistence in mice and guinea pigs. *J Infect Dis* **177**:1030-5.
203. **Liberati, N. T., J. M. Urbach, S. Miyata, D. G. Lee, E. Drenkard, G. Wu, J. Villanueva, T. Wei, and F. M. Ausubel.** 2006. An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:2833-8.
204. **Linares, J. F., I. Gustafsson, F. Baquero, and J. L. Martinez.** 2006. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:19484-9.
205. **Linares, J. F., J. A. López, E. Camafeita, P. L. Albar, F. Rojo and J. L. Martínez.** 2005. Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**:1384-1391.

206. **Liu, P. V.** 1974. Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* **130** Suppl:S94-9.
207. **Luo, N., S. Pereira, O. Sahin, J. Lin, S. Huang, L. Michel, and Q. Zhang.** 2005. Enhanced in vivo fitness of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in the absence of antibiotic selection pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:541-6.
208. **Luzar, M. A., M. J. Thomassen, and T. C. Montie.** 1985. Flagella and motility alterations in *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis: relationship to patient clinical condition. *Infect Immun* **50**:577-82.
209. **Ma, S., D. J. Wozniak, and D. E. Ohman.** 1997. Identification of the histidine protein kinase KinB in *Pseudomonas aeruginosa* and its phosphorylation of the alginate regulator algB. *J Biol Chem* **272**:17952-60.
210. **Macia, M. D., D. Blanquer, B. Togores, J. Sauleda, J. L. Perez, and A. Oliver.** 2005. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3382-6.
211. **Macia, M. D., N. Borrell, M. Segura, C. Gomez, J. L. Perez, and A. Oliver.** 2006. Efficacy and potential for resistance selection of antipseudomonal treatments in a mouse model of lung infection by hypermutable *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:975-83.
212. **Mahenthiralingam, E., M. E. Campbell, and D. P. Speert.** 1994. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* **62**:596-605.
213. **Maier, R. M., and G. Soberon-Chavez.** 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**:625-33.
214. **Mao, E. F., L. Lane, J. Lee, and J. H. Miller.** 1997. Proliferation of mutators in *A* cell population. *J Bacteriol* **179**:417-22.
215. **Martin, D. W., M. J. Schurr, M. H. Mudd, and V. Deretic.** 1993. Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* into the alginate-producing form: inactivation of *mucB* causes conversion to mucoidy. *Mol Microbiol* **9**:497-506.
216. **Martinez-Solano, L., M. D. Macia, A. Fajardo, A. Oliver, and J. L. Martinez.** 2008. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Infect Dis* **47**:1526-33.
217. **Martinez, J. L., and F. Baquero.** 2002. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* **15**:647-79.
218. **Martinez, J. L., and F. Baquero.** 2000. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:1771-7.
219. **Martinez, J. L., F. Baquero, and D. I. Andersson.** 2007. Predicting antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* **5**:958-65.
220. **Martinez, J. L., J. Blazquez, and F. Baquero.** 1994. Non-canonical mechanisms of antibiotic resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **13**:1015-22.

221. **Masduki, A., J. Nakamura, T. Ohga, R. Umezaki, J. Kato, and H. Ohtake.** 1995. Isolation and characterization of chemotaxis mutants and genes of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **177**:948-52.
222. **Mashburn, L. M., and M. Whiteley.** 2005. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature* **437**:422-5.
223. **Mattick, J. S.** 2002. Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* **56**:289-314.
224. **Maughan, H., B. Galeano, and W. L. Nicholson.** 2004. Novel *rpoB* mutations conferring rifampin resistance on *Bacillus subtilis*: global effects on growth, competence, sporulation, and germination. *J Bacteriol* **186**:2481-6.
225. **May, T. B., D. Shinabarger, R. Maharaj, J. Kato, L. Chu, J. D. DeVault, S. Roychoudhury, N. A. Zielinski, A. Berry, R. K. Rothmel, and et al.** 1991. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Rev* **4**:191-206.
226. **Mazel, D., and J. Davies.** 1999. Antibiotic resistance in microbes. *Cell Mol Life Sci* **56**:742-54.
227. **McCaw, M. L., G. L. Lykken, P. K. Singh, and T. L. Yahr.** 2002. ExsD is a negative regulator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion regulon. *Mol Microbiol* **46**:1123-33.
228. **McCleary, W. R., and D. R. Zusman.** 1990. Purification and characterization of the *Myxococcus xanthus* FrzE protein shows that it has autophosphorylation activity. *J Bacteriol* **172**:6661-8.
229. **McClure, C. D., and N. L. Schiller.** 1992. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on human monocyte-derived macrophages. *J Leukoc Biol* **51**:97-102.
230. **McGrath, S., D. S. Wade, and E. C. Pesci.** 2004. Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). *FEMS Microbiol Lett* **230**:27-34.
231. **McKnight, S. L., B. H. Iglewski, and E. C. Pesci.** 2000. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**:2702-8.
232. **McPhee, J. B., M. Bains, G. Winsor, S. Lewenza, A. Kwasnicka, M. D. Brazas, F. S. Brinkman, and R. E. Hancock.** 2006. Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB two-component regulatory systems to Mg²⁺-induced gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**:3995-4006.
233. **McPhee, J. B., S. Lewenza, and R. E. Hancock.** 2003. Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **50**:205-17.
234. **Medina, G., K. Juarez, R. Diaz, and G. Soberon-Chavez.** 2003. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *rhlR*, encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiology* **149**:3073-81.
235. **Mena, A., E. E. Smith, J. L. Burns, D. P. Speert, S. M. Moskowitz, J. L. Perez, and A. Oliver.** 2008. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. *J Bacteriol* **190**:7910-7.

236. **Merritt, J. H., K. M. Brothers, S. L. Kuchma, and G. A. O'Toole.** 2007. SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. *J Bacteriol* **189**:8154-64.
237. **Meyer, J. M., A. Stintzi, D. De Vos, P. Cornelis, R. Tappe, K. Taraz, and H. Budzikiewicz.** 1997. Use of siderophores to type pseudomonads: the three *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems. *Microbiology* **143 (Pt 1)**:35-43.
238. **Middlebrook, G., and M. L. Cohn.** 1953. Some observations on the pathogenicity of isoniazid-resistant variants of tubercle bacilli. *Science* **118**:297-9.
239. **Mikkelsen, H., N. J. Bond, M. E. Skindersoe, M. Givskov, K. S. Lilley, and M. Welch.** 2009. Biofilms and type III secretion are not mutually exclusive in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **155**:687-98.
240. **Miller, J. H.** 1996. Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair. *Annu Rev Microbiol* **50**:625-43.
241. **Mima, T., N. Kohira, Y. Li, H. Sekiya, W. Ogawa, T. Kuroda, and T. Tsuchiya.** 2009. Gene Cloning and Characteristics of the RND-Type Multidrug Efflux Pumps MuxABC-OpmB possessing two RND components in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*.
242. **Miyazaki, S., T. Matsumoto, K. Tateda, A. Ohno, and K. Yamaguchi.** 1995. Role of exotoxin A in inducing severe *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice. *J Med Microbiol* **43**:169-75.
243. **Morales, G., L. Wiehlmann, P. Gudowius, C. van Delden, B. Tummler, J. L. Martinez, and F. Rojo.** 2004. Structure of *Pseudomonas aeruginosa* populations analyzed by single nucleotide polymorphism and pulsed-field gel electrophoresis genotyping. *J Bacteriol* **186**:4228-37.
244. **Morosini, M. I., J. A. Ayala, F. Baquero, J. L. Martinez, and J. Blazquez.** 2000. Biological cost of AmpC production for *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:3137-43.
245. **Moskowitz, S. M., R. K. Ernst, and S. I. Miller.** 2004. PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *J Bacteriol* **186**:575-9.
246. **Mougous, J. D., M. E. Cuff, S. Raunser, A. Shen, M. Zhou, C. A. Gifford, A. L. Goodman, G. Joachimiak, C. L. Ordonez, S. Lory, T. Walz, A. Joachimiak, and J. J. Mekalanos.** 2006. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* **312**:1526-30.
247. **Moya, B., A. Dotsch, C. Juan, J. Blazquez, L. Zamorano, S. Haussler, and A. Oliver.** 2009. Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. *PLoS Pathog* **5**:e1000353.
248. **Mulcahy, H., J. O'Callaghan, E. P. O'Grady, C. Adams, and F. O'Gara.** 2006. The posttranscriptional regulator RsmA plays a role in the interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and human airway epithelial cells by positively regulating the type III secretion system. *Infect Immun* **74**:3012-5.
249. **Murray, T. S., and B. I. Kazmierczak.** 2008. *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. *J Bacteriol* **190**:2700-8.

250. **Nagakubo, S., K. Nishino, T. Hirata, and A. Yamaguchi.** 2002. The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of *Escherichia coli* via a novel multidrug exporter system, MdtABC. *J Bacteriol* **184**:4161-7.
251. **Nguyen, D., and P. K. Singh.** 2006. Evolving stealth: genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:8305-6.
252. **Nguyen, T. T., A. Saxena, and T. J. Beveridge.** 2003. Effect of surface lipopolysaccharide on the nature of membrane vesicles liberated from the Gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *J Electron Microsc (Tokyo)* **52**:465-9.
253. **Nikaido, H.** 2001. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Semin Cell Dev Biol* **12**:215-23.
254. **Nikaido, H.** 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**:382-8.
255. **Nilsson, A. I., E. Kugelberg, O. G. Berg, and D. I. Andersson.** 2004. Experimental adaptation of *Salmonella typhimurium* to mice. *Genetics* **168**:1119-30.
256. **O'Malley, Y. Q., K. J. Reszka, G. T. Rasmussen, M. Y. Abdalla, G. M. Denning, and B. E. Britigan.** 2003. The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**:L1077-86.
257. **O'Malley, Y. Q., K. J. Reszka, D. R. Spitz, G. M. Denning, and B. E. Britigan.** 2004. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**:L94-103.
258. **O'Toole, G. A., K. A. Gibbs, P. W. Hager, P. V. Phibbs, Jr., and R. Kolter.** 2000. The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**:425-31.
259. **O'Toole, G. A., and R. Kolter.** 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**:295-304.
260. **O'Toole, G. A., and R. Kolter.** 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* **28**:449-61.
261. **Ochsner, U. A., A. K. Koch, A. Fiechter, and J. Reiser.** 1994. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **176**:2044-54.
262. **Oliver, A., R. Canton, P. Campo, F. Baquero, and J. Blazquez.** 2000. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* **288**:1251-4.
263. **Ordway, D. J., M. G. Sonnenberg, S. A. Donahue, J. T. Belisle, and I. M. Orme.** 1995. Drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* exhibit a range of virulence for mice. *Infect Immun* **63**:741-3.
264. **Ostroff, R. M., A. I. Vasil, and M. L. Vasil.** 1990. Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **172**:5915-23.

265. **Overhage, J., M. Bains, M. D. Brazas, and R. E. Hancock.** 2008. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *J Bacteriol* **190**:2671-9.
266. **Overhage, J., S. Lewenza, A. K. Marr, and R. E. Hancock.** 2007. Identification of genes involved in swarming motility using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mini-Tn5-lux mutant library. *J Bacteriol* **189**:2164-9.
267. **Parkins, M. D., H. Ceri, and D. G. Storey.** 2001. *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Mol Microbiol* **40**:1215-26.
268. **Parmely, M., A. Gale, M. Clabaugh, R. Horvat, and W. W. Zhou.** 1990. Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **58**:3009-14.
269. **Pastor, A., J. Chabert, M. Louwagie, J. Garin, and I. Attree.** 2005. PscF is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle. *FEMS Microbiol Lett* **253**:95-101.
270. **Pearson, J. P., C. Van Delden, and B. H. Iglewski.** 1999. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* **181**:1203-10.
271. **Peng, X., C. Xu, H. Ren, X. Lin, L. Wu, and S. Wang.** 2005. Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Pseudomonas aeruginosa* responding to ampicillin, kanamycin, and tetracycline resistance. *J Proteome Res* **4**:2257-65.
272. **Perkins, A. E., and W. L. Nicholson.** 2008. Uncovering new metabolic capabilities of *Bacillus subtilis* using phenotype profiling of rifampin-resistant *rpoB* mutants. *J Bacteriol* **190**:807-14.
273. **Pesci, E. C., J. B. Milbank, J. P. Pearson, S. McKnight, A. S. Kende, E. P. Greenberg, and B. H. Iglewski.** 1999. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:11229-34.
274. **Pessi, G., F. Williams, Z. Hindle, K. Heurlier, M. T. Holden, M. Camara, D. Haas, and P. Williams.** 2001. The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**:6676-83.
275. **Poole, K.** 2001. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**:255-64.
276. **Poole, K., N. Gotoh, H. Tsujimoto, Q. Zhao, A. Wada, T. Yamasaki, S. Neshat, J. Yamagishi, X. Z. Li, and T. Nishino.** 1996. Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB*-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **21**:713-24.
277. **Potvin, E., D. E. Lehoux, I. Kukavica-Ibrulj, K. L. Richard, F. Sanschagrín, G. W. Lau, and R. C. Levesque.** 2003. In vivo functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* for high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets. *Environ Microbiol* **5**:1294-308.
278. **Pucciarelli, M. G., and F. Garcia-del Portillo.** 2003. Protein-peptidoglycan interactions modulate the assembly of the needle complex in the *Salmonella* invasion-associated type III secretion system. *Mol Microbiol* **48**:573-85.

279. **Quinn, J. P.** 1998. Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting gram-negative pathogens. *Clin Infect Dis* **27 Suppl 1**:S117-24.
280. **Rahme, L. G., F. M. Ausubel, H. Cao, E. Drenkard, B. C. Goumnerov, G. W. Lau, S. Mahajan-Miklos, J. Plotnikova, M. W. Tan, J. Tsongalis, C. L. Walendziewicz, and R. G. Tompkins.** 2000. Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:8815-21.
281. **Rakhimova, E., A. Munder, L. Wiehlmann, F. Bredenbruch, and B. Tummler.** 2008. Fitness of isogenic colony morphology variants of *Pseudomonas aeruginosa* in murine airway infection. *PLoS One* **3**:e1685.
282. **Rampioni, G., M. Schuster, E. P. Greenberg, I. Bertani, M. Grasso, V. Venturi, E. Zennaro, and L. Leoni.** 2007. RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **66**:1557-65.
283. **Rashid, M. H., and A. Kornberg.** 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:4885-90.
284. **Rebiere-Huet, J., J. Guerillon, A. L. Pimenta, P. Di Martino, N. Orange, and C. Hulen.** 2002. Porins of *Pseudomonas fluorescens* MFO as fibronectin-binding proteins. *FEMS Microbiol Lett* **215**:121-6.
285. **Reimann, C., M. Beyeler, A. Latifi, H. Winteler, M. Foglino, A. Lazdunski, and D. Haas.** 1997. The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol Microbiol* **24**:309-19.
286. **Rice, L. B.** 2007. Emerging issues in the management of infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacteria. *Cleve Clin J Med* **74 Suppl 4**:S12-20.
287. **Riese, M. J., and J. T. Barbieri.** 2002. Membrane localization contributes to the in vivo ADP-ribosylation of Ras by *Pseudomonas aeruginosa* ExoS. *Infect Immun* **70**:2230-2.
288. **Rietsch, A., and J. J. Mekalanos.** 2006. Metabolic regulation of type III secretion gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **59**:807-20.
289. **Rietsch, A., I. Vallet-Gely, S. L. Dove, and J. J. Mekalanos.** 2005. ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:8006-11.
290. **Rocchetta, H. L., L. L. Burrows, and J. S. Lam.** 1999. Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:523-53.
291. **Rodrigue, A., Y. Quentin, A. Lazdunski, V. Mejean, and M. Foglino.** 2000. Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol* **8**:498-504.
292. **Rowe-Magnus, D. A., and D. Mazel.** 2001. Integrins: natural tools for bacterial genome evolution. *Curr Opin Microbiol* **4**:565-9.
293. **Rowe-Magnus, D. A., and D. Mazel.** 2002. The role of integrins in antibiotic resistance gene capture. *Int J Med Microbiol* **292**:115-25.

294. **Roy-Burman, A., R. H. Savel, S. Racine, B. L. Swanson, N. S. Revadigar, J. Fujimoto, T. Sawa, D. W. Frank, and J. P. Wiener-Kronish.** 2001. Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis* **183**:1767-74.
295. **Roy, D., D. R. Liston, V. J. Idone, A. Di, D. J. Nelson, C. Pujol, J. B. Bliska, S. Chakrabarti, and N. W. Andrews.** 2004. A process for controlling intracellular bacterial infections induced by membrane injury. *Science* **304**:1515-8.
296. **Ruiz-Diez, B., P. Sanchez, F. Baquero, J. L. Martinez, and A. Navas.** 2003. Differential interactions within the *Caenorhabditis elegans*-*Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis model. *J Theor Biol* **225**:469-76.
297. **Rust, L., Messing, C. R., Iglewski, B. H. .** 1994. Elastase assays. *Methods Enzimol* **235**:554-62.
298. **Ryder, C., M. Byrd, and D. J. Wozniak.** 2007. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol* **10**:644-8.
299. **Sakuragi, Y., and R. Kolter.** 2007. Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**:5383-6.
300. **Salunkhe, P., T. Topfer, J. Buer, and B. Tummler.** 2005. Genome-wide transcriptional profiling of the steady-state response of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **187**:2565-72.
301. **Sambrook, J., Russell, D. W.** 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Nueva York.
302. **Sanchez, P., J. F. Linares, B. Ruiz-Diez, E. Campanario, A. Navas, F. Baquero, and J. L. Martinez.** 2002. Fitness of in vitro selected *Pseudomonas aeruginosa* *nalB* and *nfxB* multidrug resistant mutants. *J Antimicrob Chemother* **50**:657-64.
303. **Sato, H., and D. W. Frank.** 2004. ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Mol Microbiol* **53**:1279-90.
304. **Sato, H., D. W. Frank, C. J. Hillard, J. B. Feix, R. R. Pankhaniya, K. Moriyama, V. Finck-Barbancon, A. Buchaklian, M. Lei, R. M. Long, J. Wiener-Kronish, and T. Sawa.** 2003. The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *Embo J* **22**:2959-69.
305. **Sawa, T., M. Ohara, K. Kurahashi, S. S. Twining, D. W. Frank, D. B. Doroques, T. Long, M. A. Gropper, and J. P. Wiener-Kronish.** 1998. In vitro cellular toxicity predicts *Pseudomonas aeruginosa* virulence in lung infections. *Infect Immun* **66**:3242-9.
306. **Sawa, T., and J. P. Wiener-Kronish.** 2004. A therapeutic strategy against the shared virulence mechanism utilized by both *Yersinia pestis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Anesthesiol Clin North America* **22**:591-606, viii-ix.
307. **Sawa, T., T. L. Yahr, M. Ohara, K. Kurahashi, M. A. Gropper, J. P. Wiener-Kronish, and D. W. Frank.** 1999. Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury. *Nat Med* **5**:392-8.

308. **Sayner, S. L., D. W. Frank, J. King, H. Chen, J. VandeWaa, and T. Stevens.** 2004. Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *Circ Res* **95**:196-203.
309. **Schaber, J. A., W. J. Triffo, S. J. Suh, J. W. Oliver, M. C. Hastert, J. A. Griswold, M. Auer, A. N. Hamood, and K. P. Rumbaugh.** 2007. *Pseudomonas aeruginosa* forms biofilms in acute infection independent of cell-to-cell signaling. *Infect Immun* **75**:3715-21.
310. **Schertzer, J. W., M. L. Boulette, and M. Whiteley.** 2009. More than a signal: non-signaling properties of quorum sensing molecules. *Trends Microbiol* **17**:189-95.
311. **Schultz, M. J., A. W. Rijneveld, S. Florquin, P. Speelman, S. J. Van Deventer, and T. van der Poll.** 2001. Impairment of host defence by exotoxin A in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in mice. *J Med Microbiol* **50**:822-7.
312. **Schurek, K. N., A. K. Marr, P. K. Taylor, I. Wiegand, L. Semenec, B. K. Khaira, and R. E. Hancock.** 2008. Novel genetic determinants of low-level aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:4213-9.
313. **Schuster, M., and E. P. Greenberg.** 2007. Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon. *BMC Genomics* **8**:287.
314. **Schuster, M., and E. P. Greenberg.** 2006. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol* **296**:73-81.
315. **Schuster, M., A. C. Hawkins, C. S. Harwood, and E. P. Greenberg.** 2004. The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol Microbiol* **51**:973-85.
316. **Schuster, M., C. P. Lostroh, T. Ogi, and E. P. Greenberg.** 2003. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* **185**:2066-79.
317. **Semmler, A. B., C. B. Whitchurch, and J. S. Mattick.** 1999. A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **145 (Pt 10)**:2863-73.
318. **Shafikhani, S. H., C. Morales, and J. Engel.** 2008. The *Pseudomonas aeruginosa* type III secreted toxin ExoT is necessary and sufficient to induce apoptosis in epithelial cells. *Cell Microbiol* **10**:994-1007.
319. **Shaver, C. M., and A. R. Hauser.** 2004. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun* **72**:6969-77.
320. **Shenroy, A. R., and S. S. Visweswariah.** 2004. Class III nucleotide cyclases in bacteria and archaeobacteria: lineage-specific expansion of adenylyl cyclases and a dearth of guanylyl cyclases. *FEBS Lett* **561**:11-21.
321. **Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann.** 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**:850-8.
322. **Shibuya, Y., T. Yamamoto, T. Morimoto, N. Nishino, T. Kambara, and H. Okabe.** 1991. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline proteinase might share a biological function with plasmin. *Biochim Biophys Acta* **1077**:316-24.

323. **Shinabarger, D., A. Berry, T. B. May, R. Rothmel, A. Fialho, and A. M. Chakrabarty.** 1991. Purification and characterization of phosphomannose isomerase-guanosine diphospho-D-mannose pyrophosphorylase. A bifunctional enzyme in the alginate biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **266**:2080-8.
324. **Shrout, J. D., D. L. Chopp, C. L. Just, M. Hentzer, M. Givskov, and M. R. Parsek.** 2006. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol Microbiol* **62**:1264-77.
325. **Singh, P. K., M. R. Parsek, E. P. Greenberg, and M. J. Welsh.** 2002. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* **417**:552-5.
326. **Sio, C. F., L. G. Otten, R. H. Cool, S. P. Diggle, P. G. Braun, R. Bos, M. Daykin, M. Camara, P. Williams, and W. J. Quax.** 2006. Quorum quenching by an N-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infect Immun* **74**:1673-82.
327. **Sitnikov, D. M., J. B. Schineller, and T. O. Baldwin.** 1995. Transcriptional regulation of bioluminescence genes from *Vibrio fischeri*. *Mol Microbiol* **17**:801-12.
328. **Smith, E. E., D. G. Buckley, Z. Wu, C. Saenphimmachak, L. R. Hoffman, D. A. D'Argenio, S. I. Miller, B. W. Ramsey, D. P. Speert, S. M. Moskowitz, J. L. Burns, R. Kaul, and M. V. Olson.** 2006. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:8487-92.
329. **Smith, R. S., M. C. Wolfgang, and S. Lory.** 2004. An adenylate cyclase-controlled signaling network regulates *Pseudomonas aeruginosa* virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect Immun* **72**:1677-84.
330. **Sommer, M. O., G. Dantas, and G. M. Church.** 2009. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science* **325**:1128-31.
331. **Songer, J. G.** 1997. Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol* **5**:156-61.
332. **Soscia, C., A. Hachani, A. Bernadac, A. Filloux, and S. Bleves.** 2007. Cross talk between type III secretion and flagellar assembly systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**:3124-32.
333. **Southey-Pillig, C. J., D. G. Davies, and K. Sauer.** 2005. Characterization of temporal protein production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* **187**:8114-26.
334. **Spencer, R. C.** 1996. Predominant pathogens found in the European Prevalence of Infection in Intensive Care Study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **15**:281-5.
335. **Spiers, A. J., A. Buckling, and P. B. Rainey.** 2000. The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* **146** (Pt 10):2345-50.
336. **Stock, A. M., V. L. Robinson, and P. N. Goudreau.** 2000. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**:183-215.
337. **Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrener, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E.**

- Hancock, S. Lory, and M. V. Olson.** 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**:959-64.
338. **Strominger, J. L., and D. J. Tipper.** 1965. Bacterial cell wall synthesis and structure in relation to the mechanism of action of penicillins and other antibacterial agents. *Am J Med* **39**:708-21.
339. **Sundin, C., M. C. Wolfgang, S. Lory, A. Forsberg, and E. Frithz-Lindsten.** 2002. Type IV pili are not specifically required for contact dependent translocation of exoenzymes by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog* **33**:265-77.
340. **Swartz, M. N.** 1994. Hospital-acquired infections: diseases with increasingly limited therapies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:2420-7.
341. **Taddei, F., M. Radman, J. Maynard-Smith, B. Toupance, P. H. Gouyon, and B. Godelle.** 1997. Role of mutator alleles in adaptive evolution. *Nature* **387**:700-2.
342. **Taguchi, K., H. Fukutomi, A. Kuroda, J. Kato, and H. Ohtake.** 1997. Genetic identification of chemotactic transducers for amino acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **143** (Pt 10):3223-9.
343. **Tamura, M., T. Ajayi, L. R. Allmond, K. Moriyama, J. P. Wiener-Kronish, and T. Sawa.** 2004. Lysophospholipase A activity of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretory toxin ExoU. *Biochem Biophys Res Commun* **316**:323-31.
344. **Tan, M. W., and F. M. Ausubel.** 2000. *Caenorhabditis elegans*: a model genetic host to study *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **3**:29-34.
345. **Tang, H., M. Kays, and A. Prince.** 1995. Role of *Pseudomonas aeruginosa* pili in acute pulmonary infection. *Infect Immun* **63**:1278-85.
346. **Tang, H. B., E. DiMango, R. Bryan, M. Gambello, B. H. Iglewski, J. B. Goldberg, and A. Prince.** 1996. Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect Immun* **64**:37-43.
347. **Terada, L. S., K. A. Johansen, S. Nowbar, A. I. Vasil, and M. L. Vasil.** 1999. *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect Immun* **67**:2371-6.
348. **Teuber, M.** 1999. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. *Cell Mol Life Sci* **56**:755-63.
349. **Tipper, D. J., and J. L. Strominger.** 1965. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**:1133-41.
350. **Tremblay, J., A. P. Richardson, F. Lepine, and E. Deziel.** 2007. Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environ Microbiol* **9**:2622-30.
351. **Trias, J., and H. Nikaido.** 1990. Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *J Biol Chem* **265**:15680-4.

352. **Trinh, V., M. F. Langelier, J. Archambault, and B. Coulombe.** 2006. Structural perspective on mutations affecting the function of multisubunit RNA polymerases. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**:12-36.
353. **Tummler, B., U. Koopmann, D. Grothues, H. Weissbrodt, G. Steinkamp, and H. von der Hardt.** 1991. Nosocomial acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* by cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* **29**:1265-7.
354. **Urbanowski, M. L., E. D. Brutinel, and T. L. Yahr.** 2007. Translocation of ExsE into Chinese hamster ovary cells is required for transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Infect Immun* **75**:4432-9.
355. **Urbanowski, M. L., G. L. Lykken, and T. L. Yahr.** 2005. A secreted regulatory protein couples transcription to the secretory activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:9930-5.
356. **Van Delden, C., and B. H. Iglewski.** 1998. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* **4**:551-60.
357. **van Heeckeren, A. M., and M. D. Schluchter.** 2002. Murine models of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Lab Anim* **36**:291-312.
358. **Vance, R. E., A. Rietsch, and J. J. Mekalanos.** 2005. Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in vivo. *Infect Immun* **73**:1706-13.
359. **Vasil, M. L.** 2003. DNA microarrays in analysis of quorum sensing: strengths and limitations. *J Bacteriol* **185**:2061-5.
360. **Ventre, I., A. L. Goodman, I. Vallet-Gely, P. Vasseur, C. Soscia, S. Molin, S. Bleves, A. Lazdunski, S. Lory, and A. Filloux.** 2006. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:1711-6.
361. **von Bodman, S. B., J. M. Willey, and S. P. Diggle.** 2008. Cell-cell communication in bacteria: united we stand. *J Bacteriol* **190**:4377-91.
362. **von Gotz, F., S. Haussler, D. Jordan, S. S. Saravanamuthu, D. Wehmhoner, A. Strussmann, J. Lauber, I. Attree, J. Buer, B. Tummler, and I. Steinmetz.** 2004. Expression analysis of a highly adherent and cytotoxic small colony variant of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a lung of a patient with cystic fibrosis. *J Bacteriol* **186**:3837-47.
363. **Wagner, V. E., D. Bushnell, L. Passador, A. I. Brooks, and B. H. Iglewski.** 2003. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol* **185**:2080-95.
364. **Wagner, V. E., and B. H. Iglewski.** 2008. *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection. *Clin Rev Allergy Immunol* **35**:124-34.
365. **Wall, D., and D. Kaiser.** 1999. Type IV pili and cell motility. *Mol Microbiol* **32**:1-10.
366. **Wargo, M. J., T. C. Ho, M. J. Gross, L. A. Whittaker, and D. A. Hogan.** 2009. GbdR regulates *Pseudomonas aeruginosa* *plcH* and *pchP* transcription in response to choline catabolites. *Infect Immun* **77**:1103-11.

367. **West, S. E., H. P. Schweizer, C. Dall, A. K. Sample, and L. J. Runyen-Janecky.** 1994. Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **148**:81-6.
368. **Whitchurch, C. B., A. J. Leech, M. D. Young, D. Kennedy, J. L. Sargent, J. J. Bertrand, A. B. Semmler, A. S. Mellick, P. R. Martin, R. A. Alm, M. Hobbs, S. A. Beatson, B. Huang, L. Nguyen, J. C. Commolli, J. N. Engel, A. Darzins, and J. S. Mattick.** 2004. Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **52**:873-93.
369. **Whitchurch, C. B., T. Tolker-Nielsen, P. C. Ragas, and J. S. Mattick.** 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**:1487.
370. **Whitehead, N. A., A. M. Barnard, H. Slater, N. J. Simpson, and G. P. Salmond.** 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**:365-404.
371. **Whiteley, M., M. R. Parsek, and E. P. Greenberg.** 2000. Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**:4356-60.
372. **WHO.** 2000. Overcoming antibiotics resistance. World Health Organization Report in Infectious Disease.
373. **Wick, M. J., A. N. Hamood, and B. H. Iglewski.** 1990. Analysis of the structure-function relationship of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Mol Microbiol* **4**:527-35.
374. **Wiehlmann, L., Salunkhe, P., Larbig, K., Ritzka, M. Tummler, B. .** 2002. Signature tagged mutagenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. . *Genome Letters* **1**:1-9.
375. **Wiehlmann, L., G. Wagner, N. Cramer, B. Siebert, P. Gudowius, G. Morales, T. Kohler, C. van Delden, C. Weinel, P. Slickers, and B. Tummler.** 2007. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:8101-6.
376. **Wieland, C. W., B. Siegmund, G. Senaldi, M. L. Vasil, C. A. Dinarello, and G. Fantuzzi.** 2002. Pulmonary inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide, phospholipase C, and exotoxin A: role of interferon regulatory factor 1. *Infect Immun* **70**:1352-8.
377. **Wiener-Kronish, J. P., T. Sakuma, I. Kudoh, J. F. Pittet, D. Frank, L. Dobbs, M. L. Vasil, and M. A. Matthay.** 1993. Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P. aeruginosa* pneumonia in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol* **75**:1661-9.
378. **Wilderman, P. J., A. I. Vasil, Z. Johnson, M. J. Wilson, H. E. Cunliffe, I. L. Lamont, and M. L. Vasil.** 2001. Characterization of an endoprotease (PrpL) encoded by a PvdS-regulated gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **69**:5385-94.
379. **Wilharm, G., V. Lehmann, K. Krauss, B. Lehnert, S. Richter, K. Ruckdeschel, J. Heesemann, and K. Trulzsch.** 2004. *Yersinia enterocolitica* type III secretion depends on the proton motive force but not on the flagellar motor components MotA and MotB. *Infect Immun* **72**:4004-9.
380. **Wilson, J. W., M. J. Schurr, C. L. LeBlanc, R. Ramamurthy, K. L. Buchanan, and C. A. Nickerson.** 2002. Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgrad Med J* **78**:216-24.
381. **Williams, P.** 2007. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* **153**:3923-38.

382. **Winstanley, C., and J. L. Fothergill.** 2009. The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. *FEMS Microbiol Lett* **290**:1-9.
383. **Wiuff, C., R. M. Zappala, R. R. Regoes, K. N. Garner, F. Baquero, and B. R. Levin.** 2005. Phenotypic tolerance: antibiotic enrichment of noninherited resistance in bacterial populations. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1483-94.
384. **Woestyn, S., A. Allaoui, P. Wattiau, and G. R. Cornelis.** 1994. YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. *J Bacteriol* **176**:1561-9.
385. **Wolfgang, M. C., V. T. Lee, M. E. Gilmore, and S. Lory.** 2003. Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. *Dev Cell* **4**:253-63.
386. **Wood, J. M., E. Bremer, L. N. Csonka, R. Kraemer, B. Poolman, T. van der Heide, and L. T. Smith.** 2001. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **130**:437-60.
387. **Wright, G. D.** 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol* **5**:175-86.
388. **Yahr, T. L., and D. W. Frank.** 1994. Transcriptional organization of the trans-regulatory locus which controls exoenzyme S synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **176**:3832-38.
389. **Yahr, T. L., and E. P. Greenberg.** 2004. The genetic basis for the commitment to chronic versus acute infection in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Cell* **16**:497-8.
390. **Yahr, T. L., A. J. Vallis, M. K. Hancock, J. T. Barbieri, and D. W. Frank.** 1998. ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:13899-904.
391. **Yahr, T. L., and M. C. Wolfgang.** 2006. Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol* **62**:631-40.
392. **Yang, L., J. A. Haagensen, L. Jelsbak, H. K. Johansen, C. Sternberg, N. Hoiby, and S. Molin.** 2008. In situ growth rates and biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* populations in chronic lung infections. *J Bacteriol* **190**:2767-76.
393. **Yates, E. A., B. Philipp, C. Buckley, S. Atkinson, S. R. Chhabra, R. E. Sockett, M. Goldner, Y. Dessaux, M. Camara, H. Smith, and P. Williams.** 2002. N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **70**:5635-46.
394. **Yeung, A. T., E. C. Torfs, F. Jamshidi, M. Bains, I. Wiegand, R. E. Hancock, and J. Overhage.** 2009. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is controlled by a broad spectrum of transcriptional regulators, including MetR. *J Bacteriol* **191**:5592-602.
395. **Yim, G., H. H. Wang, and J. Davies.** 2007. Antibiotics as signalling molecules. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **362**:1195-200.
396. **Yoon, S. S., R. F. Hennigan, G. M. Hilliard, U. A. Ochsner, K. Parvatiyar, M. C. Kamani, H. L. Allen, T. R. DeKievit, P. R. Gardner, U. Schwab, J. J. Rowe, B. H. Iglewski, T. R. McDermott, R. P. Mason, D. J. Wozniak, R. E. Hancock, M. R. Parsek, T. L. Noah, R. C.**

Boucher, and D. J. Hassett. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev Cell* **3**:593-603.

397. **Yoshihara, E., and T. Nakae.** 1989. Identification of porins in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* that form small diffusion pores. *J Biol Chem* **264**:6297-301.

398. **Zapun, A., C. Contreras-Martel, and T. Vernet.** 2008. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev* **32**:361-85.

399. **Zhang, Y., Q. Deng, J. A. Porath, C. L. Williams, K. J. Pederson-Gulrud, and J. T. Barbieri.** 2007. Plasma membrane localization affects the RhoGAP specificity of *Pseudomonas* ExoS. *Cell Microbiol* **9**:2192-201.

400. **Zhou, L., J. Wang, and L. H. Zhang.** 2007. Modulation of bacterial Type III secretion system by a spermidine transporter dependent signaling pathway. *PLoS One* **2**:e1291.

401. **Zolfaghar, I., A. A. Angus, P. J. Kang, A. To, D. J. Evans, and S. M. Fleiszig.** 2005. Mutation of *retS*, encoding a putative hybrid two-component regulatory protein in *Pseudomonas aeruginosa*, attenuates multiple virulence mechanisms. *Microbes Infect* **7**:1305-16.

8 Índice de Tablas

Tabla 1: Cepas bacterianas, líneas celulares y modelo animal utilizado en este trabajo	29
Tabla 2: Construcciones empleadas en este trabajo	31
Tabla 3: Oligonucleótidos usados en este trabajo	32
Tabla 4: Sensibilidad a los antibióticos de cepas silvestres de <i>P. aeruginosa</i> utilizados en esta Tesis. CMI ($\mu\text{g}/\text{m}$).....	43
Tabla 5: Número de mutantes con variaciones en sensibilidad a los antibióticos y citotoxicidad simultáneamente.....	45
Tabla 6: Genes cuya mutación produce cambios en la sensibilidad a los antibióticos de <i>P. aeruginosa</i>	47
Tabla 7: Categorías funcionales de genes involucrados en la sensibilidad a los antibióticos de <i>P. aeruginosa</i>	51
Tabla 8: Identificación de proteínas secretadas en condiciones de T3S	53
Tabla 9: Efecto que tiene la inserción del transposón en la motilidad de los mutantes de la genoteca 59.20	65
Tabla 10: Efecto que tiene la inserción del transposón en la motilidad de los mutantes de la genoteca TB.....	69
Tabla 11: Concentraciones mínimas inhibitorias ($\mu\text{g}/\text{ml}$) de mutantes en el gen <i>PA4112</i>	72
Tabla 12: Factores de virulencia: Resultados de los análisis de la producción de distintos factores de virulencia para los mutantes en el gen <i>PA4112</i>	72
Tabla 13: Concentraciones mínimas inhibitorias ($\mu\text{g}/\text{ml}$) en el mutante de inserción en el gen <i>PA5542</i>	76
Tabla 14: Concentraciones mínimas inhibitorias frente a β -lactámicos ($\mu\text{g}/\text{ml}$) para las cepas de <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i> que expresan el gen <i>PA5542</i> desde un promotor heterólogo.....	76
Tabla 15: Concentraciones mínimas inhibitorias frente a carbapenemas y aztreonam ($\mu\text{g}/\text{ml}$) para las cepas de <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i> que expresan el gen <i>PA5542</i> desde un promotor heterólogo.	77
Tabla 16: Factores de virulencia: Resultados de los análisis de la producción de distintos factores de virulencia, de la formación de biofilm y de la citotoxicidad sobre macrófagos para los mutantes en el gen <i>PA5542</i>	79
Tabla 17: Concentraciones mínimas inhibitorias ($\mu\text{g}/\text{ml}$) para los mutantes en el gen <i>wspE: PA3704</i>	83

Tabla 18: Factores de virulencia: Resultados de los análisis de la producción de distintos factores de virulencia, de la formación de <i>biofilms</i> y de la citotoxicidad sobre macrófagos para los mutantes en el gen <i>wspE</i> : PA3704.....	83
Tabla 19: Concentraciones mínimas inhibitorias (µg/ml) para los mutantes en el gen <i>muxB</i> : PA2527.	87
Tabla 20: Factores de virulencia: Resultados de los análisis de la producción de distintos factores de virulencia, de la formación de <i>biofilm</i> y de la citotoxicidad sobre macrófagos para los mutantes en el gen <i>muxB</i> : PA2527.	87
Tabla 21: Número de ratones vivos tras 7 días de infección crónica..	91

9 Índice de Figuras

Figura 1: Mecanismos de acción de los antibióticos (Izquierda). Mecanismos de resistencia a los antibióticos (Derecha).	8
Figura 2: Determinantes de virulencia en <i>P. aeruginosa</i>	13
Figura 3: Esquema del T3SS en <i>P. aeruginosa</i> .	16
Figura 4: Control de la expresión génica del T3SS en <i>P. aeruginosa</i> .	18
Figura 5: Sistema QS en <i>P. aeruginosa</i> .	21
Figura 6: Formación del <i>biofilm</i> en <i>P. aeruginosa</i> .	23
Figura 7: Adaptación de <i>P. aeruginosa</i> a la infección en pacientes de CF: factores que se necesita para infección aguda e infección crónica.	26
Figura 9. Sensibilidad a los antibióticos de los mutantes de <i>P. aeruginosa</i> .	44
Figura 10. Análisis de citotoxicidad y valores de CMI de los mutantes de <i>P. aeruginosa</i> .	46
Figura 11: Identificación por MALDI-TOF de proteínas secretadas en condiciones de T3S.	53
Figura 12: Comparación de citotoxicidad y de proteínas secretadas bajo condiciones de T3S de los mutantes de inserción en las cepas de <i>P. aeruginosa</i> 59.20 y TB.	57
Figura 13: Análisis de factores de virulencia regulados por QS: pioverdina, piocianina, elastasa, caseinasa y <i>biofilms</i> , combinados con los datos de citotoxicidad y valores de CMI de los mutantes de la genoteca 59.20.	59
Figura 14: Análisis de factores de virulencia regulados por QS: pioverdina, piocianina, elastasa, caseinasa y <i>biofilms</i> , combinados con los datos de citotoxicidad y valores de CMI de los mutantes de la genoteca TB.	60
Figura 15: Análisis de la motilidad de los mutantes en la genoteca 59.20.	64
Figura 16: Análisis de la motilidad de los mutantes en la genoteca TB.	68
Figura 17: Esquema de la delección del gen <i>PA4112</i> del cromosoma de PAO1.	71
Figura 18: Patrón de secreción del T3SS de los mutantes en el gen <i>PA4112</i> .	73
Figura 19: Ensayos de motilidad en los mutantes para el gen <i>PA4112</i> .	74
Figura 20: Esquema de la delección del gen <i>PA5542</i> del cromosoma de PA14.	76
Figura 21: Análisis cuantitativo de la actividad β -lactamasa.	78
Figura 22: Análisis de la actividad imipenemasa.	78

Figura 23: Amplificación del gen <i>pA5542</i> en el ADN genómico de distintas cepas de <i>P. aeruginosa</i> ..	79
Figura 24: Patrón del T3SS del mutante de inserción en <i>PA5542</i> (I), mutante complementado (C) y mutante de delección (Δ)..	80
Figura 25: Ensayos de motilidad en los mutantes en el gen <i>PA5542</i> ..	81
Figura 26: Esquema de la delección del gen <i>PA3704</i> del cromosoma de PAO1 y PA14.	83
Figura 27: Patrón de T3SS del mutante de inserción en <i>PA3704</i> (I), mutante complementado (C) y de delección (Δ)..	84
Figura 28: Ensayo de motilidad para el ver el efecto de la inserción (AF16), complementación (AF18) o delección (AF21 en PAO1 y AF23 en PA14) del gen <i>PA3704</i> en <i>P. aeruginosa</i>	85
Figura 29: Esquema de la delección del gen <i>PA2527</i> del cromosoma de PAO1.	87
Figura 30: Patrón de secreción tipo III del mutante de inserción (I), complementado (C) y delección (Δ) en el gen <i>muxB: PA2527</i>	88
Figura 31: Ensayos de motilidad en los mutantes en el gen <i>muxB: PA2527</i> .	89
Figura 32: Porcentaje de supervivientes tras siete días después de la infección aguda.	90
Figura 33: Porcentaje de supervivientes tras siete días después de la infección crónica.	90
Figura 34: Recuento bacteriano en pulmón de los ratones vivos tras siete días de infección crónica.....	92
Figura 35: Recuento bacteriano en el BAL 48horas post-infección crónica.....	92